腹膜透析排液由来細胞の分画および腹膜機能の診断への応用

東, 洋

三重大学, 2011.
三重大学大学院工学研究科博士前期課程分子素材工学専攻

http://hdl.handle.net/10076/12918

平成 **23** 年度　修士論文

腹膜透析排液由来細胞の分画および
腹膜機能の診断への応用

三重大学大学院工学研究科　博士前期課程

分子素材工学専攻

東　洋

目次

1. 緒言

1-1. 腎不全と腹膜透析療法

1-1-1. 腹膜透析療法と合併症

現在日本において食の欧米化が進み，脂質を摂取する機会が増え，メタボリックシンドロームの増加が社会的問題となっている。それに伴い 1998 年以降，透析原疾患としてそれ以前まででは慢性糸球体腎炎が 1 位であったが，糖尿病性腎症が 1 位となっている(Table.1-1)。それらの疾患によって腎臓の働きが 30%以下になることを腎不全と言い, 10%以下になると末期腎不全となり透析療法が必要となる。本邦では透析患者数は毎年 1 万人ずつ増加している一方で全世界でも 2010 年には 210 万人に達する勢いである(Fig.1-1-1)。

透析療法には大きく分類して血液透析と腹膜透析の 2 種類が存在している。腹膜透析(Peritoneal Dialysis : PD)では，Fig.1-1-2 に示すように，患者自身の腹腔内に高濃度 D-glucose を浸透圧勾配形成物質として利用した透析液を注入し，腹膜を介して拡散と限外濾過によって水・老廃物(尿として排出されるべき物質)の除去，電解質，pH の調整を行う療法である。血液透析では週に 3 回，1 回 4~5 時間の通院治療が必要であるが，腹膜透析は自己管理が中心の在宅療法であるため，月に 1~2 回の診察だけで良い。そのため，就学や就労がしやすい事，残存腎機能の維持がしやすい事，必要な器材や薬液が血液透析に比べ僅かで済み生産コストの面でも，医療廃棄物処理の面でも，さらには設備投資が全く必要無い点など，経済効果が大きい事など利点も多い。医学的にも，連続的な水・老廃物除去による循環器系への負担軽減から，特に高齢者への適応がさらに広がるかと期待される。しかしその一方で透析液中の主成分である D-glucose や glucose 分解産物(glucose degradation products : GDPs)の影響による溶質透過性亢進や除水不全, さらには腹膜線維症や腹膜硬化症といった合併症が問題となっている[1]。その為，腹膜機能を維持し, 長期の治療を可能することが PD の大きな課題となっている。また，腹膜機能維持状態を評価するために，簡便かつ無侵襲的な診断方法の確立が不可欠である。

Fig. 1-1-1. 透析患者数の推移

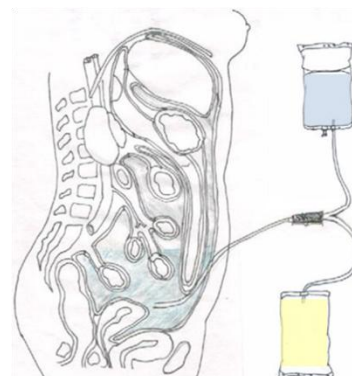



Fig. 1-1-2. 腹膜透析

Table. 1-1. 透析原疾患

原疾患	患者数	%	順位
糖尿病性腎症	14,968	42.9	1
慢性糸球体腎炎	8,914	25.6	2
不明	3,454	9.9	3
腎硬化症	3,262	9.4	4
その他	903	2.6	5
多発性嚢胞腎	827	2.4	6
急速進行性糸球体腎炎	421	1.2	7
慢性腎盂腎炎	295	0.8	8
悪性高血症	269	0.8	9
SLE腎炎	268	0.8	10
移植後再導入	224	0.6	11
アミロイド腎	168	0.5	12
腎・尿路腫瘍	158	0.5	13
その他分類不能の腎炎	149	0.4	14
骨髄腫	137	0.4	15
閉塞性尿路障害	128	0.4	16
痛風腎	113	0.3	17
腎・尿路結石	75	0.2	18
腎形成不全	51	0.1	19
妊娠腎/妊娠中毒症	44	0.1	20
腎・尿路結核	19	0.1	21
先天性代謝異常による腎不全	30	0.1	22

1-1-2. 腹膜透析排液と腹膜評価法

腹膜透析療法は透析効率を維持させるために，一日数回透析液を交換する必要がある。そのため，腹膜透析療法においては透析排液が必然的に廃棄される。この透析排液には透析によって体内から排出された水や老廃物が主に含まれている。老廃物とは尿素，尿酸，クレアチニン(Cr) 等であり，ナトリウムイオン，カリウムイオン，カルシウムイオンといった電解質もバランスを調整され透析排液中に含まれる。また細胞成分としては，マクロファージやリンパ球・好中球といった血球系細胞や腹膜を構成する腹膜中皮細胞などが含まれることが Betjes らによって報告されている[2][3](Fig.

1-1-3)。

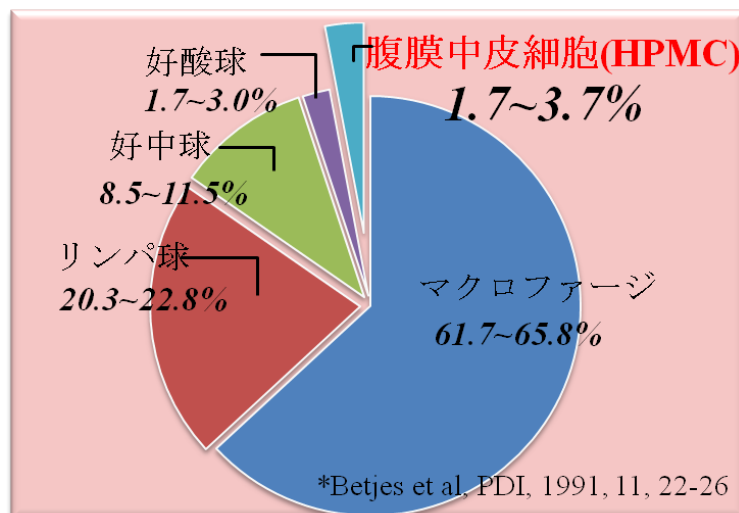



Fig. 1-1-3. 腹膜透析排液に含まれる細胞群[2]

腹膜透析排液から得られる情報は多く，腹膜機能を評価するためにも利用されている。腹膜透析療法において腹膜機能の評価は非常に重要であるが，一般的に尿毒素を取り除く効率及び水分を取り除く効率という機能に着目して腹膜機能は評価されている。ここでは腹膜機能評価法について紹介する。

①腹膜平衡試験(Peritoneal Equilibrium Test: PET)

1987 年に Twaswski らが導入した試験法である[4]。2.5% glucose を含有する腹膜透析液 2L を 4 時間貯留して，完全に排液し，注液終了時より 2 時間後に採血し，血液検査を行う。その後血中(P)および透析排液中(D)の Cr 濃度を測定し，Cr の D/P 比を算出し，さらに 0，4 時間目の透析液の糖濃度を測定し，D/D0 glucose 濃度比を算出する。これらの D/P -Cr と D/D0-glucose 比によって Fig. 1-1-4 のように H，HA，LA，L に分類して評価する。H は溶質透過性が亢進し除水不全傾向にある。L では逆の評価となる。H は腹膜硬化と関連するが，1 回の PET で決定できるものではなく，PD 期間の増加とともに H の傾向が強まれば，腹膜機能が劣化してきたと判断されるものである[5]。

②中皮細胞診

被嚢性腹膜硬化症(EPS)予防のための PD 中止基準として，一般的に PD 期間 8 年以上と PET でのカテゴリーH であるが，Yamamoto らは中皮細胞診による中止基準を報告してきた[6]。中皮細胞診は腹膜表面より

排液中に脱落した中皮細胞の細胞面積を測定することで中皮細胞の障害を推測する検査である。Yamamoto らは EPS 状態および前 EPS 状態予防のためのアルゴリズムを作成し，PD 期間と中皮細胞診から得た結果より病期を Stage Ⅰ~Ⅲc まで分類し，PD 中止基準として提案している(Fig. 1-1-5) [5][6]。

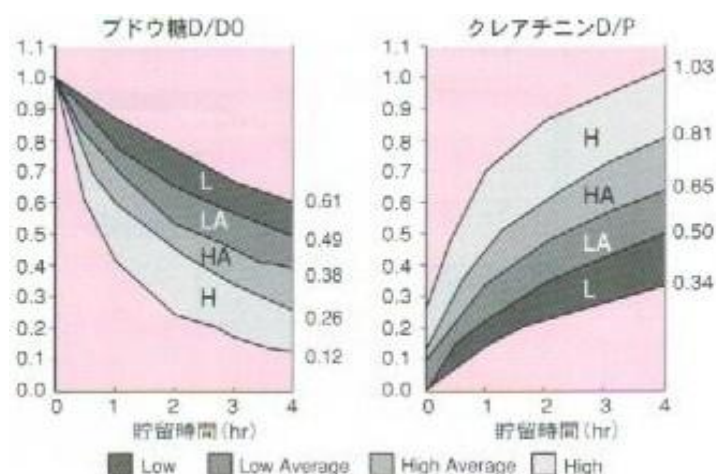



Fig. 1-1-4. 腹膜平衡試験(PET)の評価[5]

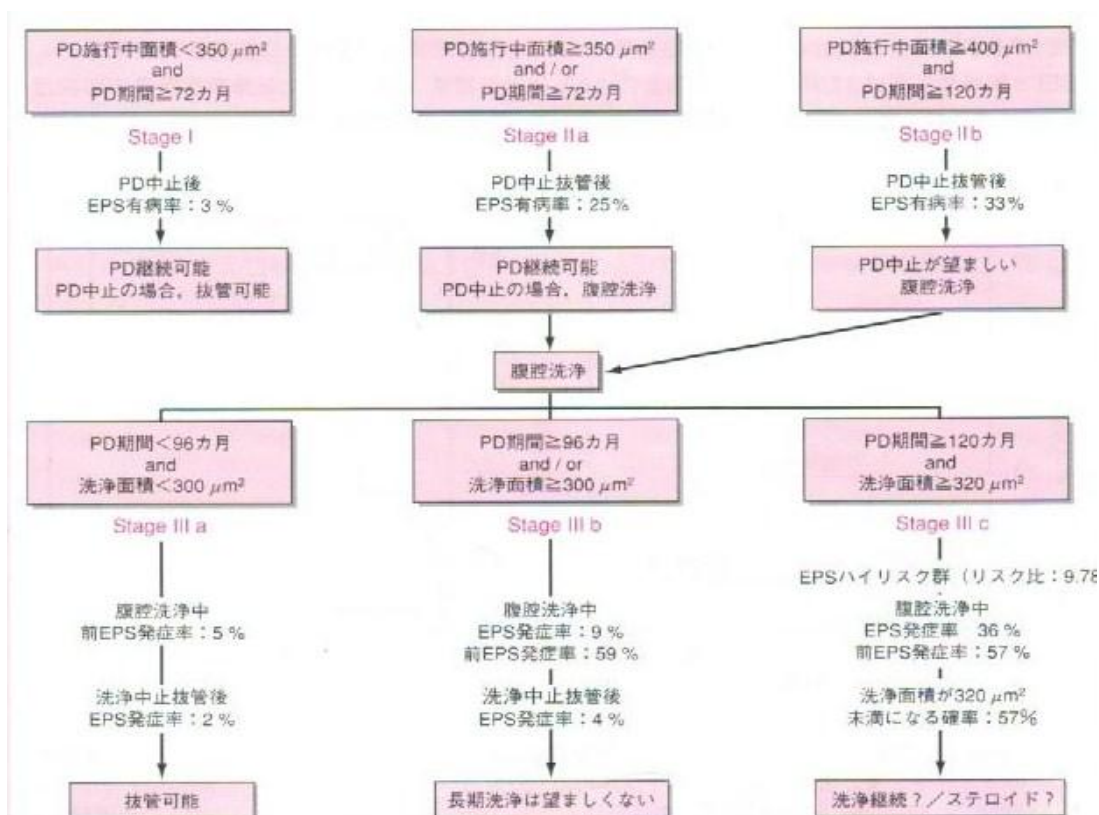



Fig. 1-1-5. PD 症例における EPS および前 EPS 予防のためのアルゴリズム[5]

③排液 CA125 濃度

中皮細胞は CA125(cancer antigen 125)を産生し，排液中の CA125 濃度は中皮細胞の量に比例していると考えられている。症例毎により異なる値となるため正常値は設定されていないため，症例毎の経時的変化でみる方がよいとされている[7]。

④MMP‐9，MMP－2

MMP(matrix metalloproteinase)は細胞外基質の分解酵素であり，腹膜炎などの炎症の際，好中球や中皮細胞が MMP‐9 を産生し基底膜を分解し間質層へ浸潤するため排液中の MMP‐9 が増加すると考えられている。また MMP‐2 は腹膜マクロファージ，中皮細胞，筋線維芽細胞および血管内皮細胞から分泌され間質を分解し，その結果腹膜肥厚につながるとの報告がなされているため，診断マーカーとしての有用性があると考えられている[8][9]。

⑤IL‐6

IL‐6(interleukin-6)は中皮細胞，線維芽細胞及び好中球やマクロファージが産生し，急性腹膜炎時に排液中 IL‐6 濃度は一過性に上昇することや慢性の腹膜線維化と平行して上昇することが知られていることから，IL‐6 も腹膜機能評価のマーカーとして考えられている。

上記の評価以外にも腹膜生検や, 排液中のヒアルロン酸濃度や FDP(Fibrin degradation product)濃度や P1CP(corboxy-terminal propeptide of type 1 procollagen)などが挙げられる。これらの試験によって腹膜機能を評価しているが腹膜機能状態を正確に捉えることは困難であり，まだ不十分であるといえる。そのため，腹膜機能を診断する新たなマーカーや診断方法の開発が必要であると考えられる。

1-1-3. 腹膜と腹膜中皮細胞

腹膜透析療法で生体半透膜として利用される腹膜は，胃や肝臓といった腹部の臓器の全体ないし一部及び腹壁を覆っている薄い漿膜組織である。この腹膜はたくさんの微絨毛を持つ一層の中皮細胞と、膠原繊維、弾性繊維、ヒアルロン酸などの細胞外マトリクスなどが存在する基底膜下の間質から構成された生体複合膜である。間質組織中に線維芽細胞、脂肪細胞、肥満細胞、マクロファージなどの細胞や毛細血管が散在する構造をとる(Fig.1-1-6)。

（microvilli, MV ; cilium, C ; junctional complex, JC ; lamellar body, LB ; elastic lamina, EL ; mast cell, M ; fibroblast, F ; Pericyte, P ;endothelium, E; capillary, CAP ; basement membrane, BM）

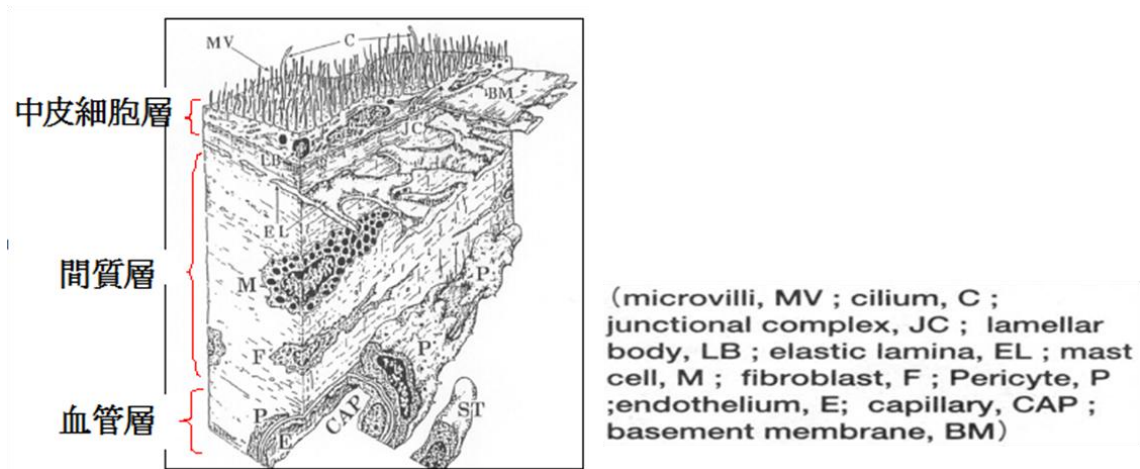



Fig. 1-1-6. 正常な腹膜の形態学的模式図

腹膜の厚さは 50~150μm で、壁側腹膜と臓側腹膜に囲まれた空間を腹腔と称す。

腹膜の機能

①腹部臓器が自由に動けるように滑面を提供する

②臓器・器官の癒着防止

腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cells：HPMCs)は細胞単層を形成する上皮系細胞である。腹膜中皮細胞は長さ 2～3μm、直径 0.08μm の微絨毛の厚い外套に覆われていて、微絨毛は細胞表面一面に一様に広がっている(Fig.1-1-7)。微絨毛はリン脂質を分泌し、臓器間の癒着を防ぐ働きをしている。中皮細胞同士は斜めに重なり合い、固く組み合うように接着している。

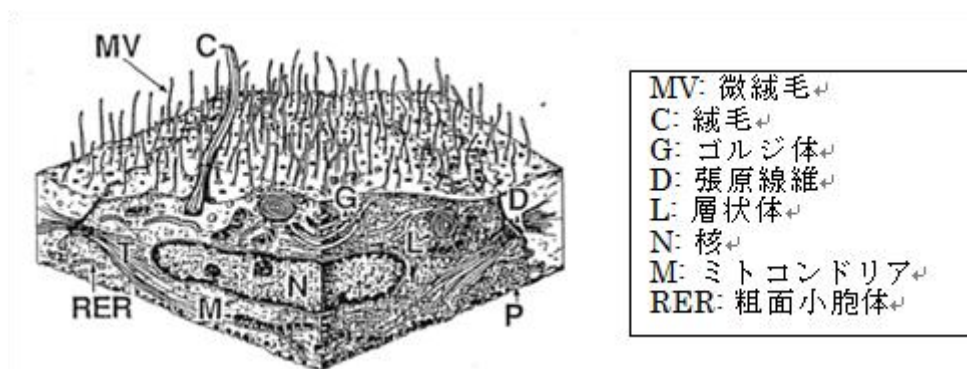



Fig. 1-1-7. 正常中皮細胞の形態学的模式図

1-2. Epithelial to mesenchymal transition (EMT)

1-2-1. EMT とは

細胞間接着の消失に関連する現象に EMT(Epithelial to mesenchymal transition)がある。これは初期胚発生時における原腸陥入，心臓や腎臓，口蓋形成などの器官形成過程，神経堤細胞の運動，癌転移，また種々の線維症に関わる現象であり，上皮系細胞が線維芽様の間葉系細胞へと形質変換することである[10][11]。これにより細胞間接着が減少し，それに伴って細胞極性を損失し間葉系細胞の特徴が現れる。上皮系細胞に顕著に見られる細胞接着分子は EMT を起こすことにより消失することが報告されている。例えば，Occludin，ZO-1，E-cadherin 等である[12][13]。これに対し，細胞間接着分子を減少させる転写因子である Snail，細胞骨格を形成する α-SMA，間質の主成分である Collagen I，また細胞接着・遊走に関与すると考えられている Fibronectin 等が EMT により増加する事が報告されている[10][14][15]。この EMT を起こした細胞の特徴としては，細胞間接着が消失することで個々の細胞が遊走能や浸潤能を得ることが挙げられる。

EMT は先に述べたように生体内で必要な現象であるが，種々の病気など望まれない場合では EMT を調節し，防ぐ必要があると言える。

1-2-2. EMT 誘導因子

EMT を誘導する物質として様々なサイトカインやタンパク質の存在が知られている。EMT を誘導する因子としては Table. 1-2 に示すような因子が報告されており，これらの因子が細胞表面の受容体に働くことで，シグナル伝達を引き起こすと考えられる。

Table. 1-2 EMT 誘導因子

TGF-β1 (transforming growth factor-β1)	透析液組成の影響により中皮細胞がオートクリンで産生し，その影響により EMT を引き起こすことがしられている 。[10][16]
AGEs (advanced glycation end products)	タンパク質に糖が結合した物質。AGE が糖尿病の腎臓における尿細管間質線維症の発達の役割を担っている事が報告されており，EMT に大きく関与していると考えられる[17][18]。
EGF (epidermal growth factor)	細胞増殖，遊走，細胞外マトリックス産生などの機能を持つ。血小板から分泌される。血管新生時に EGF が発現し，EMT を引き起こすことが知られている[19]。

FGF (fibroblast growth factor)	上皮細胞やマクロファージなどから産生され，線維芽細胞など，特定の細胞を成長，増殖，または分化させる因子[20][21]。また，創傷時における線維芽細胞増殖や血管新生時においても発現する。
IL-1 (interleukin-1)	リンパ球の分化・増殖を促進する因子として同定されている。炎症がおこると単球やマクロファージなどから産生され，血管内皮への付着，および血管内膜への侵入を促進すると知られている[22]。
TNF-α (tumor necrosis factor-α)	E-cadherin を抑制し, ビメンチン発現を促進して MMP9 活動を活性化させることで EMT を引き起こす[23]。

組織においてはこれら様々な因子が相互作用をし，より EMT が進行することが報告されている。この中でも特に TGF-β1 は EMT を引き起こし，線維症などを誘動する主要な EMT 誘導因子として知られている[24]。

1-2-3. Cytokeratin-18

HPMC が EMT を受けることによって中皮マーカーである Cytokeratin-18 のタンパク発現が減少することが報告されている(Table. 1-3)[25] [26] [27]。ここでは Cytokeratin-18 を含むケラチン中間径フィラメントについて説明する。

まずサイトケラチンとはケラチン，ビメンチン，膠線維性酸性タンパク質，神経線維タンパク質，ラミン，ネスチンの 6 種類に分類される中間径フィラメントの一つであり，現在 21 種のペプチド(K1～K21)が同定されている。これらは分子量(MW)と等電点(pI)により 2 つのタイプに大別される。タイプ I は小さめで酸性(MW:40~63kDa，pI:4.9~6.1)で K9~21 の 13 種で，タイプ II は大きめで弱塩基(MW:53~67kDa，pI:6.1~7.8)で K1~8 の 8 種である。ケラチンの最小基本単位は 2 本鎖からなるヘリックス構造と考えられている。この二量体が 2 つ逆平行に結合して四量体サブユニットができ，これが基本のサブユニットであり，それをもとにフィラメントを形成している(Fig. 1-2-1)[28]。二量体が逆平行に並ぶため，それから形成される中間径フィラメントは極性のない構造であるといえる。

人の上皮では，ケラチン分子の発現と分化が明確にされており，表皮の角化型(K1/K10)，角膜分化型(K3/K12)，粘膜上皮型(K4/K13)，上皮基底細胞型(K5/K14)，過増殖型(K6/K16)，単層上皮型(K7，8/K17，18)さらにケラチンペアが欠損している手掌足底型(K9)とに大別される。腹膜中皮細胞は単層

上皮型に分類されるため, HPMC で発現しているケラチン分子は K7, 8/K17, 18 のケラチンペアである[29]。

上皮系細胞ではケラチンフィラメントは特殊化した細胞結合構造のデスモソームとヘミデスモソームに結合している。細胞内のケラチンフィラメントはデスモソームを介して隣の細胞のケラチンフィラメントに結合しているので，上皮全体に連続的に網目構造が張り巡らされる(Fig. 1-2-2)[28]。これによって上皮系細胞は機械的強度を得ることが出来ていると考えられている。

Table. 1-3. 腹膜中皮細胞(HPMC)の分子マーカー変化[26] [27]

Molecular marker	Omentum	Peritoneal dialysis effluent Epithelioid	Peritoneal dialysis effluent Fibroblast-like	Fibroblast
E-cadherin	+++	+	–	–
Snail (mRNA)	–	+/–	+++	+++
ICAM-I	+++	+++	+++	–
Cytokeratins	+++	++	+/–	–
Calretinin	+++	++	+/–	–
Vimentin	+	++	+++	+++
CA125	+++	+++	+++	–
VEGF	+	++	+++	–
Fibronectin	+/–	+	+++	+++
Collagen I	+/–	+	+++	+++
α-SMA	–	+/–	++	++[a]
CTGF	+	+	ND	+++
TGF-β	+	+	ND	++[a]
N-cadherin	–	+	++	++
CD34	–	–	–	+++[b]

ICAM-I = intercellular adhesion molecule-1; CA125 = cancer antigen 125; VEGF = vascular endothelial growth factor; α-SMA= α-smooth muscle actin; CTGF = connective tissue growth factor; TGF-β = transforming growth factor beta; ND = not determined.

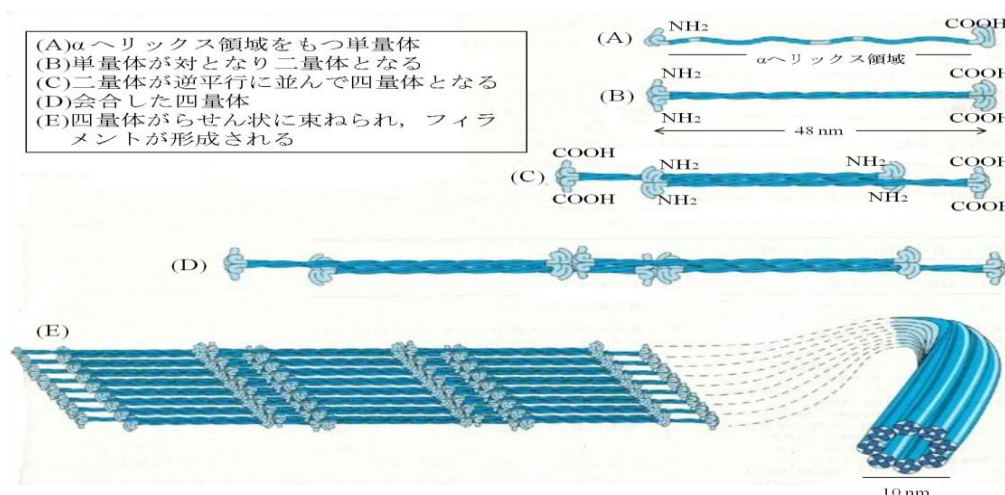



Fig. 1-2-1. 中間径フィラメント形成モデル[28]

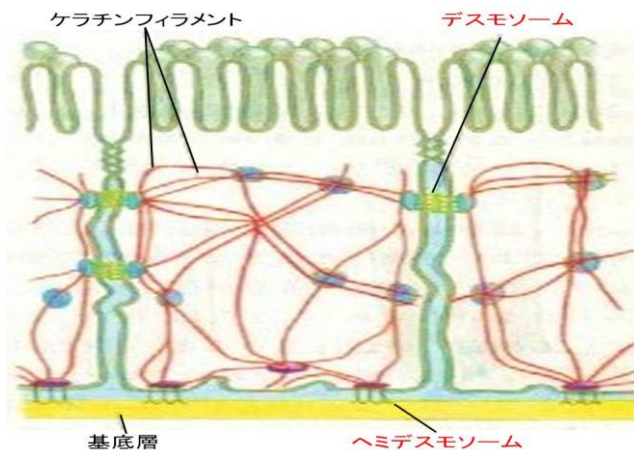



Fig. 1-2-2. 中間径フィラメントの細胞内分布[28]

1-2-4. α-SMA

HPMC の EMT の間葉系マーカーの一つとして α-smooth musle actin (α-SMA)が挙げられる。α-SMA は細胞骨格を構成するアクチンフィラメントに分類されるタンパク繊維である。

アクチンは全ての真核細胞に存在する細胞骨格タンパクであり，量の最も多いタンパク質で全細胞タンパクの 5%以上を占める。アクチンの構造は球状アクチン(G アクチン)とアクチンフィラメント(F-アクチン)があり，アクチンフィラメントは細胞内で安定な構造と不安定な構造をとる。安定な構造では微絨毛の芯や筋細胞の収縮装置の重要な構成成分となっている。一方，細胞運動の多くは，不安定な構造に依存していると考えられている。脊椎動物におけるアクチンは筋肉アクチンと細胞骨格アクチンの 2 種類に大別され，筋肉アクチンと細胞骨格アクチンにはさらにいくつかのアイソフォームが存在することが知られている。哺乳類においては，骨格筋 α，心筋 α，平滑筋 α と γ の 4 種類の筋肉アクチンと，細胞骨格 β と γ の 2 種類が知られている。α, β, γ の名称は等電点の違いから名付けられたものであり，α が最も酸性度が高い。

細胞内では，収縮性のアクチンフィラメントの束が接着帯に隣接して細胞膜と並行して存在している。アクチンフィラメントの束は，α，β，γ-カテニン，ビンキュリン，α-アクチニン，プロコグロビンといった細部内付着タンパクを通して細胞膜に連結している[30]。HPMC のような細胞間結合が発達した上皮系細胞では，このように隣接する細胞同士のアクチンフィラメントが結合タンパクと付着タンパクを介して互いに連結しあい，細胞同士をつなぎ合わせる網目構造を作っている(Fig. 1-2-3) [28]。

アクチンフィラメントは極性があり，両端の構造が異なっている。一端は比較的不活性でゆっくり伸長するマイナス端，もう一端は早く伸長す

るプラス端となっている。これらの一端にアクチンが重合したり，脱重合することでアクチンフィラメントは収縮する機能を有し，さらに架橋されることでストレスファイバーを形成し，細胞に張力を与えている。また仮足において伸長・収縮を行うことで細胞に運動性を与えている。

HPMCを含む上皮系細胞がEMTを受けることによって細胞間結合が低下するに伴ってα-SMA発現が上昇し，細胞の運動・遊走能が顕著に増加することが多数報告されている。また腹膜透析排液に脱落したHPMCにおいても発現が増加していることが報告されている(Table. 1-3)[26][27]。

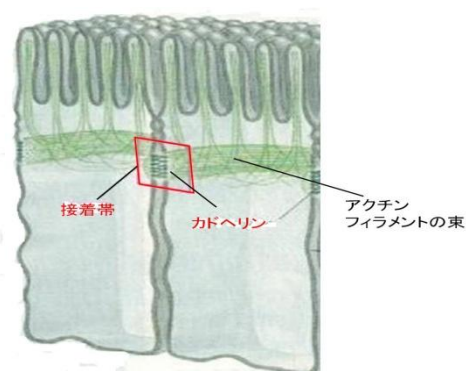



Fig. 1-2-3. アクチンフィラメントと細胞間結合[28]

1-3. 細胞間結合と膜間電気抵抗(TER)測定

1-3-1. 細胞極性と細胞間結合

細胞極性は細胞の形態，分裂，細胞結合あるいは細胞間相互作用を非対称化し，細胞の振る舞いや機能に方向性を与える役割を担っており，生物の発生や細胞の機能発現に欠かせない特質である。多細胞生物ではその極性を維持するために細胞同士が直接結合する機構が発達している。この細胞同士の接着に関与する多くの分子が同定されてきた。接着分子は細胞表面に均一に分布するのではなく，ある領域に集まって機能している場合が多い。このような領域は細胞接着装置として知られている。細胞間接着に関与する細胞接着装置としては脊椎動物では4種類知られており、Tight junction (TJ)，Adherens junction (AJ)，Desmosome (DS)，Gap junction(GJ)と呼ばれている(Fig.1-3-1)[28]。AJにはcadherinが接着分子として裏打ち蛋白であるcateninを介してアクチンフィラメントに結合している。DSでもやはりcadherin様の接着分子が中間系フィラメントと結合している。これら2つの接着装置は，その結合力を細胞骨格につなげることで，組織全体としての機械的強度を保つ役割を果たし，細胞間隙の距離は15-20nmに保たれている。

それに対してTJは細胞間隙の距離を限りなくゼロにまで近づけている特殊な接着装置である。この構造は特に細胞間の物質移動の制御に重要な役割を担っていると考えられる。これらの細胞間接着が消失し極性が失われると細胞は様々な影響を受けるといえる。

細胞極性に関与すると言われる TJ は，水分子もすり抜けられないほど細胞間を密着させている。TJ は選択的に物質透過を制御する構造であり，主要な膜貫通タンパクは claudin と occludin いい，TJ の形成と機能に必須である。claudin と occludin は ZO タンパク(zonula occluden protein)と結合している。claudin，occludin，ZO タンパクのほかにもいくつかのタンパクが TJ に付随している(Fig.1-3-2)[31]。これらの中には上皮細胞の極性を調節するもの，物質を細胞膜の適切な部位に配送する役を果たすものもある。

AJ は TJ のすぐ下に連続した接着帯を作り，連結した細胞を囲んでいることが多い。隣り合う細胞の接着帯は並んでおり，細胞膜同士は膜貫通タンパクの cadherin で結ばれている。

名称	機能
Tight junction(TJ) 密着結合	上皮細胞層で隣接細胞を封印して細胞間から分子がもれないようにする
Adherens junction (AJ) 接着結合	隣接細胞間でアクチン束を連結する
Desmosome (DS) デスモソーム	隣接細胞間で中間径フィラメントを連結する
Gap junction(GJ) ギャップ結合	小さな水溶性イオンや分子を通過させる
Hemidesmosome(HD) ヘミデスモソーム	細胞の中間径フィラメントを基底膜に固定する

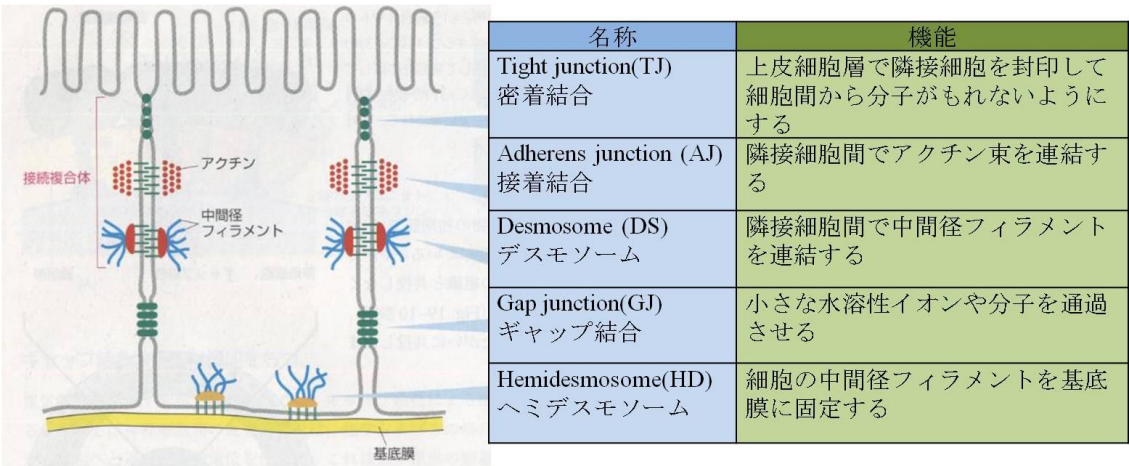



Fig. 1-3-1. 細胞間結合と機能[28]

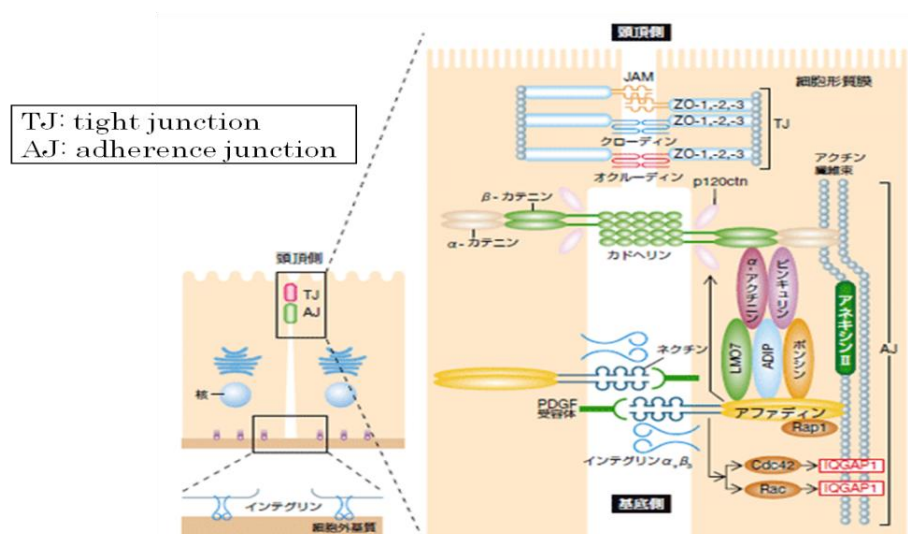



Fig.1-3-2. tight junction と adherence junction の模式図[31]

1-3-2. 膜間電気抵抗(TER)測定

EMT の評価として細胞間結合の消失が挙げられると先にも述べたが，細胞間結合形成能の変化を電気的に測定する方法として，膜間電気抵抗(Transepithelial electrical resistance)測定がある。これは膜上で培養した細胞に電流を流して電圧を測定することで抵抗値を得て，その抵抗値の変化で細胞の増殖やそれに伴う細胞間接着の形成などを判定するという測定法である。TER 測定は細胞層を介して設置された電極間に交流矩形波電流を流すことで電子の移動方向が変化し，それに追随して培地中の陽イオン(主に Na^+)の移動によって生じる電位変化を測定している。ここで細胞内液，細胞外液，細胞膜についてコンデンサー成分と抵抗成分の並列回路と考えることで Fig. 1-3-3a のような細胞の電気的等価回路ができる。細胞内液と細胞外液のコンデンサー成分は小さく，細胞膜の抵抗成分は大きいためさらに Fig.1-3-3b のように簡略化できる。また，12.5Hz という低周波では誘電率が高く，導電率が低いことから，細胞の電気等価回路では細胞膜-細胞内への電流の流れを阻止し，細胞外液つまり細胞間隙のみに電流が流れるものと考えられる(Fig. 1-3-3c)。よって低周波領域での TER 測定から得られる抵抗値は細胞間隙の構造を反映するものと考えられる。従って，その流路を構成する接着タンパクの密集性や結合性，種類により抵抗値は変化すると考えられる[32]。特に TER 測定においては tight junction が関与すると考えられる。

本研究室では腹膜に存在する腹膜中皮細胞(HPMC)と臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)，ヒト結腸癌由来細胞(Caco-2)，間葉系幹細胞(MSC)の 4 つの細胞について TER 測定が行われてきた。また HPMC と HUVEC に関しては

酸化ストレスである過酸化水素(H_2O_2)を曝露した研究も行われ，HPMC は H_2O_2 曝露によって細胞間接着を消失することがわかっており，その結果を Table.1-2 に示す[32][33][34] [35] [36]。

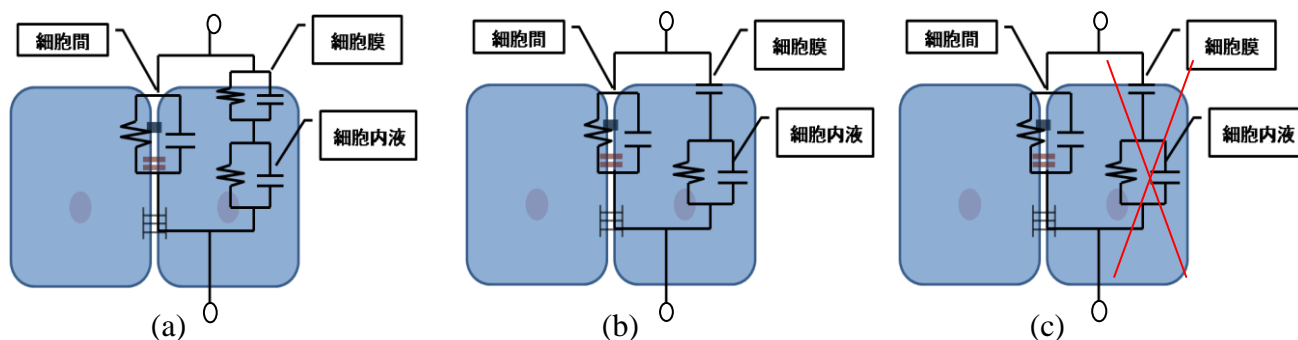



Fig. 1-3-3. 細胞の電気的等価回路

Table. 1-3.　膜間電気抵抗(TER)測定結果(Ω・cm^2) [32][33][34][36]

細胞腫	正常	H_2O_2 曝露後
HPMC	32.5±3.4	17.4±4.9
HUVEC	23.7±3.2	21.5±6
Caco-2	500-600	-
MSC	15±4	-

1-4. 細胞老化

1-4-1. 複製老化

ヒトの正常組織から単離した細胞は，培養環境下で有限の回数分裂した後，増殖能力を失い，増殖を停止する。この有限の分裂の限界はヘイフリック限界と呼ばれ，ヘイフリック限界に達し増殖を停止した場合，これは複製老化と呼ばれる。未分化細胞を除いた正常ヒト細胞では，染色体末端テロメアを伸長する酵素であるテロメアーゼを持たないため，合成期(S 期)にテロメアを完全に複製することが出来ず，増殖を重ねる結果，テロメアが短小化する(Fig. 1-4-1)。短小化したテロメアは DNA 損傷部位を活性化し続け，その結果細胞は増殖を停止する。テロメアーゼを強制発現させた正常細胞では細胞分裂に伴うテロメアの短小化および DNA 損傷部位を活性化させないことから，複製老化はテロメア短小依存の細胞老化であると考えられている[37]。複製老化によって細胞は，増殖能の低下とともに，細胞の肥大化，pH 6.0 条件での β-ガラクトシダーゼ活性の増加やクロマチンの凝

縮などの変化を示すことが知られている[38]。

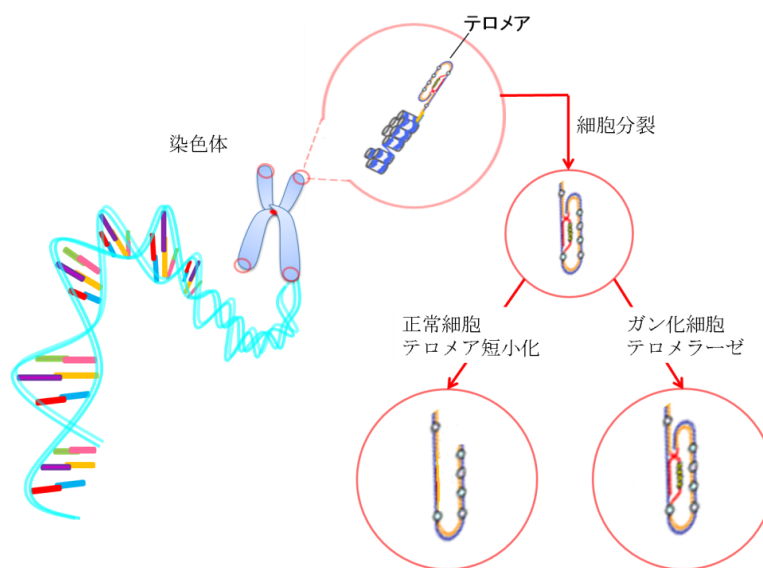



Fig. 1-4-1. テロメア短小化概要

1-4-2. 腹膜透析療法と細胞老化

細胞老化には上述した複製老化だけではなく様々なストレスによってテロメア短小に依存しない細胞老化が起こることが知られている。これはストレス誘導性早期老化と呼ばれ，in vitro における培養ストレスや酸化ストレス，ガン遺伝子の活性化といった様々なストレスによって誘導される。これらのストレスの内，最も早期老化を誘導するストレスとして注目されているのは酸化ストレスである。

ミトコンドリア電子伝達系でのエネルギー捕捉のためには，酸素分子の 4 電子還元を伴うが，中間産物として反応性が高い活性酸素種が同時に生じる。活性酸素種は過酸化水素やヒドロキシルラジカルなどにも代謝され，生体内の高分子と反応し，細胞に対して様々な機能劣化をもたらす。このような酸化ストレスに対して細胞はグルタチオンなどの抗酸化物質を産出し活性酸素種を除去したり，機能劣化を修復するような防御反応を示す。しかし，この防御反応を超過する酸化ストレスが蓄積した場合には，細胞はアポトーシスや老化を示すことが示された[39][40]。過度な酸化ストレスによって DNA 損傷がより多く蓄積しそれに伴って細胞老化を誘導する p53 タンパク質が活性化されるという報告からも，ストレス誘導性早期老化が酸化ストレスに起因するものと考えられる[41]。

腹膜透析療法においては浸透圧勾配形成物質として用いられている高濃度 glucose 由来のストレス誘導性早期老化が亢進されているものと考えられ，腹膜機能の低下の一因となっている可能性があると言える[42]。

2. 目的

腹膜透析排液中には血球系細胞をはじめ様々な細胞が存在する。その内，腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cell:HPMC)は腹膜を構成する主要な細胞であり，腹膜透析による腹膜の温存状態を反映するものと考えられる。そこで本研究では，腹膜透析排液中に脱落した HPMC の細胞機能を評価することにより，脱落した HPMC の特徴抽出を行い，腹膜機能の無侵襲診断方法としての可能性を判定することを目的とした。

3. 方法

本研究で使用した試薬・機器に関する詳細なデータに関しては、10.APPENDIX に示した。

3-1. 実験系の作成

3-1-1. 腹膜透析排液由来細胞の分離・培養

実験に使用した腹膜透析排液は、三重大学医学部付属病院血液浄化療法部で治療中の腹膜透析患者から頂いた。腹膜透析患者は男性 6 名，女性 1 名で，年齢は 67 ± 17 才(50~83 才)で透析期間は 32 ± 28 ヶ月(2~57 ヶ月)である(Table. 3-1)。

Initial	A	B	C	E	H	N	O
性別	M	M	M	M	M	M	F
年齢	83	77	69	62	83	50	68
CAPD期間 (month)	39~57	11~30	24~27	4	2~16	37~50	20
透析液の種類	①②	①	①	①②③	①③	①③	①
腹膜炎(回)	1	0	1	0	0	1	0
使用透析液量	1500~2000	1500, 2000	1500	1500	1500	1500, 2500	1500
サンプル数	12	13	4	3	5	13	2

透析液の種類
①Baxter ダイアニール N PD-2 1.5 ②Baxterダイアニール N PD-2 2.5 (③Baxter エクストラニール)

Table. 3-1. 腹膜透析患者情報

〈細胞分離・培養方法〉

上述の腹膜透析排液に濾過滅菌した 5.0mmol EDTA / 5ml NaCl Solution を透析排液バッグのカテーテルからシリンジを用いて無菌的に加え排液全体に広がるようによく振り混ぜた。透析排液を遠心ボトル(TA-18)に移し 800 rpm で 10 分間遠心した。その後，遠心菅に移し遠心し、1ml の細胞懸濁液を作成した。血球計算盤を用いて細胞数をカウントし，プラスチック培養φ35mm シャーレに播種し，細胞培養培地 10% FBS/M199 で培養した。培地は 2，3 日置きに交換した。

排液由来 HPMC の詳細な分離方法および使用器具・試薬は、APPENDIX にて記した。

3-1-2. 腹膜透析排液由来細胞の初期細胞接着率の算出

腹膜透析排液由来細胞はφ35mm シャーレで培養され，増殖の様子を位相差顕微鏡(CK2，Olympus，Tokyo，Japan)にて観察し，デジタルカメラ CAMEDIA C-3040 ZOOM にてランダムに 4 ヶ所その画像を撮影し、パーソナルコンピューターに取り込んだ(Fig. 3-1-1)。経時的に画像を撮影し，細胞数をカウントすることで，グラフを作成し，その片対数グラフの切片から初期接着細胞数を算出した(Fig. 3-1-2)。

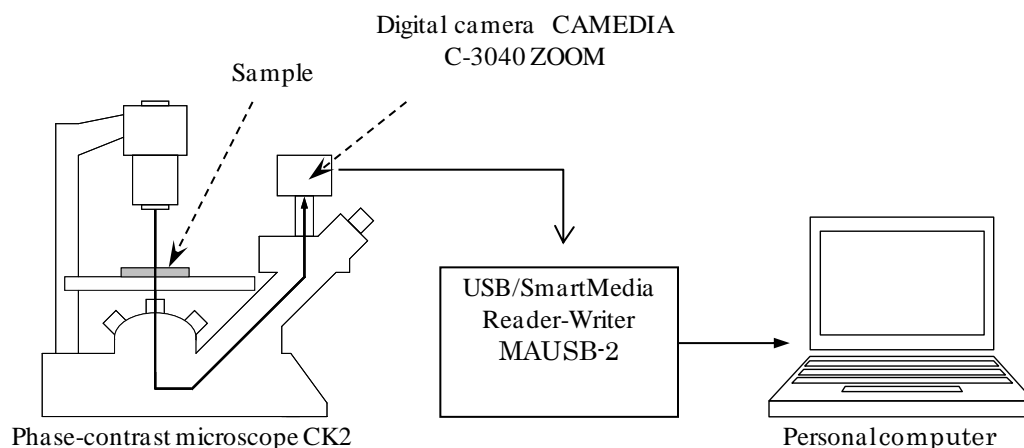



Fig.3-1-1. 画像取り込みダイアグラム

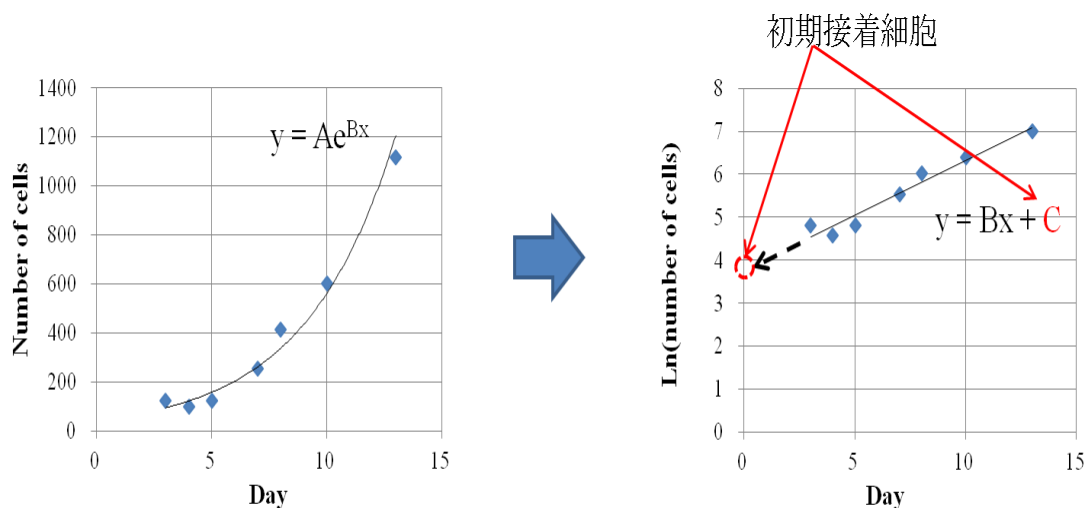



Fig. 3-1-2. 初期接着細胞数の算出方法

3-1-3. 非腹膜透析組織由来腹膜中皮細胞・間葉系幹細胞の培養

非透析組織由来腹膜中皮細胞(HPMC)はヒト腹腔内体網から採取した。体網からの腹膜中皮細胞の採取（初代培養）及び継代培養は生体材料化学研究室の共通プロトコル（APPENDIX A-1. 細胞培養プロトコル 参照）に従った。ここではその概略を記す。

本研究で使用した HPMC は、予め本学医学部倫理委員会によって患者組織の採取につき承認(No.369)を得て、informed consent を得た患者から頂いた大網組織に由来する。腹腔内手術から得られたヒト大網塊を親指大の切片に切り分けた後、10%trypsin/PBS 溶液により HPMC を単離・採取し、各種 supplement 及び 10%FBS を添加した M199 を用いて培養フラスコ内で培養した。本研究では継代数が 2~3 代目の細胞から細胞密度が 5×10^5 個/ml の細胞懸濁液を作成し、6 穴プレート及びφ35 シャーレ、24 穴プレートに播種した後、confluent または subconfluent まで培養したものを使用した。培地は 3 日に 1 回交換した。

また，本研究で使用した間葉系幹細胞(MSC)は、理化学研究所バイオリソースセンターから購入した MSC を用いた。5000cells/cm^2 で細胞を播種し、培地に 3ng/μl bFGF を添加した 10%FBS/DMEM を用いてφ35 シャーレで培養した。培地は 3 日に 1 回交換した。

3-2. 腹膜透析排液由来接着細胞の cytokeratin-18, α-SMA 発現測定

腹膜透析由来接着細胞の特異タンパク発現は免疫化学蛍光染色によって測定した。特異タンパクとして中皮細胞マーカーである cytokeratin-18 及び間葉系マーカーである α-SMA に着目した。免疫化学蛍光染色は生体材料化学研究室の共通プロトコルに従って行なった。ここではその概略を記す。

腹膜透析排液由来細胞をφ35 シャーレ及びセルデスク上でサブコンフルエントまで培養し，培地を吸引し PBS で洗浄した後，アセトン/メタノールによって固定した。次に，1% BSA/PBS でブロッキングし，希釈倍率 1 : 200 で希釈した Anti-cytokeratin-18 mouse mono antibody (Funakoshi, Japan) 及び anti-human smooth muscle actin antibody (Dako, Glostrup, Denmark)一次抗体溶液を添加し，4℃で overnight 反応させた。その後，1% BSA/PBS で 3 回洗浄し，希釈倍率 1 : 200 で希釈した二次抗体 Goat anti-mouse IgG(H+L) FITC conjugate antibody (Millipore, MA, USA)と反応させた。サンプルは走査型共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)によって観察した。タンパク発現率はそれぞれランダムに撮影された画像から少なくとも 100 個の細胞数をカウントすることによって測定した。

3-3.　腹膜透析排液由来接着細胞の cytokeratin-18, α-SMA タンパク定量

タンパク質を抽出し、α-SMA 発現量の経時的測定を行った。タンパク質の抽出法及び BCA 法によるタンパク質の定量、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング、抗体反応とバンドの定量は体材料化学研究室の共通プロトコル(APPENDIX A-4. Western Blotting 法　参照)に従った。ここでは、簡単にその概要を記す。

3-3-1. タンパク質の抽出と BCA 法による定量

腹膜透析排液由来 HPMC に、細胞溶解液を 300μl 加え、さらに protease inhibitor(SIGMA)及び phosphatase inhibitor(SIGMA)をそれぞれ 1μl ずつ加えた。室温で 15 分ほど軽く浸盪した後、セルスクレーパーで細胞を掻き取った。冷却遠心機で 15000rpm/30 分遠心し、上澄み液を取った。抽出したタンパク質溶液は‐20 度で冷凍保存した。A 溶液と B 溶液を 50:1 で混合したもの 100μl に対して、サンプル及びスタンダード(BSA)を 10μl ずつ加えた。37℃/30 分静置し、OD_{562} を測定した。スタンダードのタンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作成した。その検量線を元にサンプルの総タンパク質濃度を測定した。

3-3-2. SDS-PAGE によるタンパク質の分離

ゲル板に running gel(10% or 15%アクリルアミドゲル(Wako))と stacking gel(4.5%アクリルアミドゲル)溶液を加え、コームを取り付けて 1h 静置してゲル化させた。コームを取り外し、ウェルを作成した。泳動バッファーを満たした電気泳動槽にゲル板を固定した。抽出したタンパク質溶液とサンプルバッファーを 1:1 で混合し、熱湯 100℃/3 分でボイルした。各ウェル内にサンプルをタンパク量 3，6μg として計算した量をローディングした。15mA・定電圧で BPB 線が適度な位置に来るまで電気泳動した。

3-3-3. 膜への転写(Western Blotting)

電気泳動終了前に running gel と同じ大きさに切ったブロッティング用膜(ATTO)をメタノールに 20 秒浸し、さらに B 溶液に 15 分浸盪させた。また running gel と同じ大きさに切ったブロッティング濾紙を A 溶液に 2 枚、B 溶液に 1 枚、C 溶液に 3 枚浸した。電気泳動終了後、running gel を B 溶液に浸した。ブロッティング装置に、準備していた A 溶液に浸していたブロッティン

グ濾紙2枚を乗せ、さらにB溶液に浸していた濾紙1枚、PVDF膜、running gel、C溶液に浸していた濾紙3枚の順番に上に重ねてセットした。膜面積×2mAの電流で40分ブロッティングした。ブロッティング後にブロッキング溶液で10分間ブロッキングを行い、PBSTで10分毎に3回洗浄した。その後、一次抗体溶液を添加して4℃でover night行った。

3-3-4. 抗体反応とバンドの定量

PBSTで10分毎に3回洗浄した。洗浄後二次抗体をPVDF膜に添加して室温下で10分間静置した。再びPBSTで10分毎に3回洗浄した。ECL1液と2液をそれぞれ1:1で混ぜ、PVDF膜上に添加し、3分間静置した。LAS4000 mini EPUVでバンドをスキャンし画像を保存した。保存した画像をImage Jで定量を行った。具体的な方法は APPENDIX A-4.　Western Blotting法に従った。

3-4.　膜間電気抵抗(TER)測定

3-4-1. Transwellへの播種

腹膜透析排液由来 HPMC(PDE-HPMC), 非腹膜透析組織由来 HPMC (nonPD-HPMC), 間葉系幹細胞(MSC)の細胞懸濁液(細胞密度$1×10^5$ cells/cm^2)を、ポリエステルフィルター(孔径 0.4μm, 培養面積 1 cm^2, Transwell, 12well-type, Costar, MA, USA)上に播種し10%FBS/M199または10%FBS/DMEM培地で培養した。apical側には0.5ml、basal側には1.5mlの培地を加え、3日に1回培地交換を行った。すべての実験はP1-2の細胞を用いた。

3-4-2. TER測定

培養の際、EVOM ボルトオームメーターと STX-2 電極(World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA)(Table.3-1)を用いて膜間電気抵抗値(TER: Transepithelial electrical resistance)の測定を行った(Fig.3-2)。STX-2電極は2本の電極対で構成され、外側の電極は、試料膜を介して電流を流すための微小な銀電極、内側の電極は微小な銀／塩化銀電極で電圧検知用±20μA の交流矩形波電流を12.5Hzの低周波で流し、膜間の電圧を測定することでオームの法則$R = E/I$より抵抗値を算出した。

測定に先立ち、STX-2電極は70%エタノールに10分浸漬し、殺菌処理をした。apical側、basal側の培地を37℃に加温した新しい培地に交換した。測定値は、ポリエステルフィルターのみの抵抗値をblankとして、その差として示した。同時に位相差顕微鏡による観察も行い、TERとの関係を評価した。

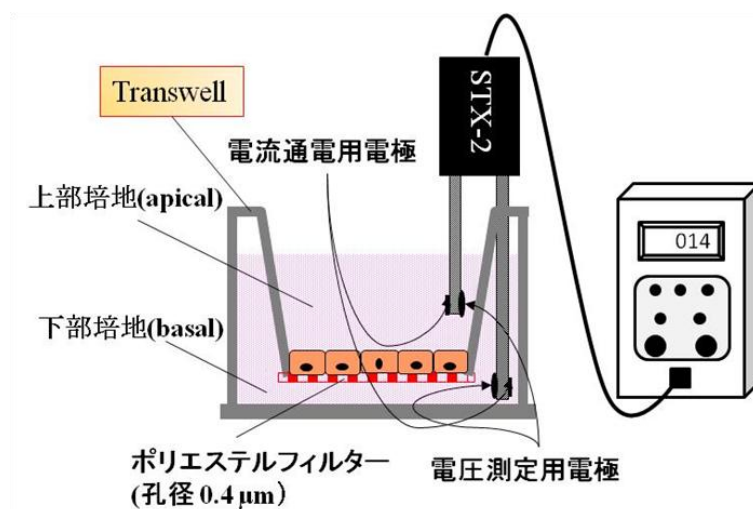



Fig. 3-2. TER 測定装置図

Table. 3-1. EVOM / STX-2 電極の装置概要

膜電圧範囲	±199.9mV
抵抗範囲	0~1999Ω，0~20kΩ の 2 レンジ
交流矩形波電流	±20µA，12.5Hz
電極	銀／塩化銀電極（電圧測定用） 銀電極（電流通電用）

3-5.　腹膜透析排液由来細胞の増殖能，面積測定

3-1-2 で初期細胞接着率を算出した方法と同様に経時的に細胞数をカウントし，グラフの傾きから増殖定数を算出した。

また，腹膜透析排液由来 HPMC をコンフルエントまで培養し，位相差顕微鏡上で細胞の形態を写真撮影し，ランダムに細胞を 50 個選択し，解析ソフト Image J を用いて面積を測定した。

詳細は APPENDIX A-5.に記述した。

3-6.　腹膜透析排液由来接着細胞の老化細胞染色

老化細胞の染色は老化関連 β‐galactosidase(senescent-associated β-galactosidase: SA-β-Gal)染色キット(Sigma, Saint Louis, USA)を用いて行われた。ここでは，その概略を記す。

腹膜透析排液由来 HPMC はセルデスク上で培養後，培地を吸引し，PBS で洗浄し，固定液によって細胞を固定した。固定液を除き再び PBS で洗浄した後，Staining Mixture を添加し，細胞が青色を呈するまで 37℃でインキュベートした(CO_2 非存在下)。染色後，位相差顕微鏡で細胞を観察し，染色された細胞と総細胞数をカウントすることで SA-β-Gal 陽性細胞率を算出した。

詳細は APPENDIX　A-6. SA-β-Gal 染色に記述した。

3-7. 統計分析

統計的な有意性は StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。Control に対する有意差を出す際には、t 検定(対応あり)で試験を行い、control 以外のデータの比較の際には、t 検定(対応なし)で試験を行うことで確率値(P 値)の算出を行い、P 値<0.05 を有意と認識した。

4. 結果

4-1. 腹膜透析排液由来細胞の初期接着率および形態観察

腹膜透析排液から分離した細胞の内，プラスチック培養シャーレに接着した細胞の割合は約 3%であった(Fig.4-1-1)。

腹膜透析排液から分離し接着した細胞を confluent まで培養すると，正常組織から分離した腹膜中皮細胞と同様に敷石上の形態を示す細胞が多く見られた(Fig.4-1-2)。しかし，敷石上形態を示す細胞以外にも肥大した細胞や紡錘状の形態を示す細胞の存在も確認された。

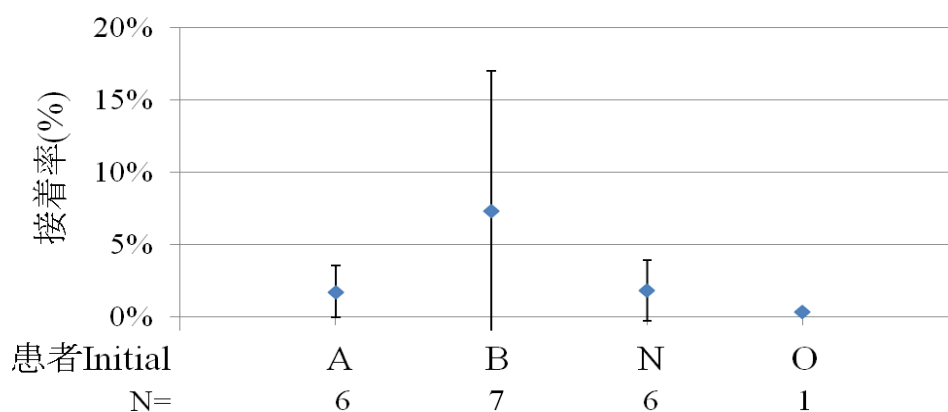



Fig.4-1-1. 腹膜透析排液由来細胞の初期接着率

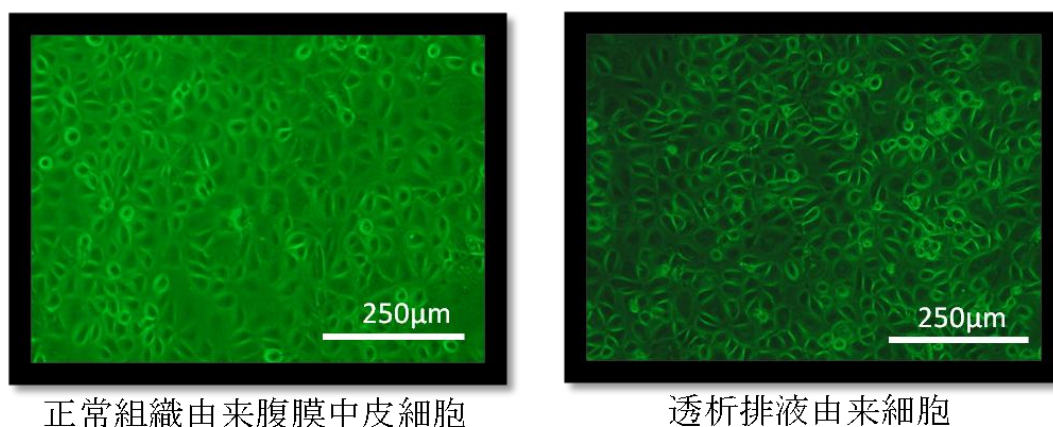
正常組織由来腹膜中皮細胞

透析排液由来細胞

Fig. 4-1-2. 腹膜透析排液由来細胞の形態 (×100)

4-2. 腹膜透析排液由来細胞の Cytokeratin-18, α-SMA タンパク発現

4-2-1. cytokeratin-18 タンパク発現

腹膜透析排液由来の接着細胞は中皮細胞マーカーである Cytokeratin-18 タンパクを患者，サンプルに関することなく約 98%で発現が示された(Fig. 4-2-1ab)。この結果より，腹膜透析排液由来の接着細胞は腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cells : HPMC)であることが示され，これらの細胞を腹膜透析排液由来 HPMC とした。

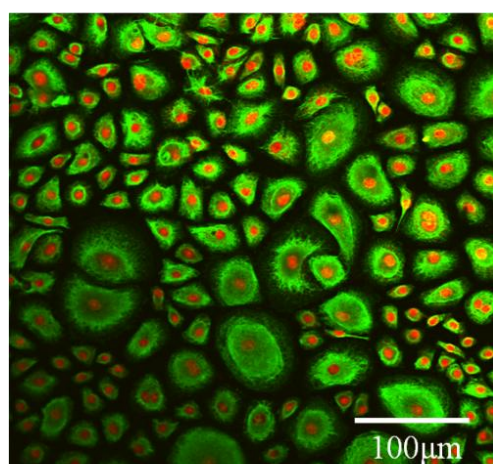



Fig. 4-2-1a. Cytokeratin-18 タンパク染色画像

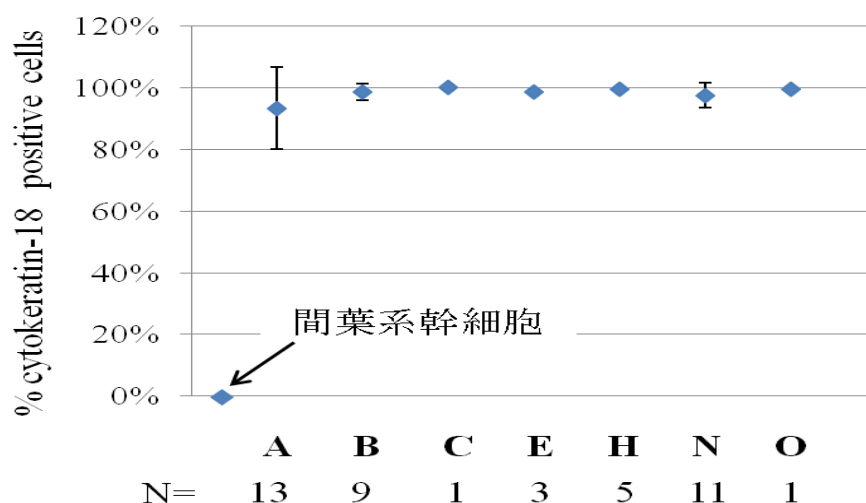



Fig. 4-2-1b. 患者別 Cytokeratin-18 タンパク発現

4-2-2. α-SMA タンパク発現

一方, 腹膜透析排液由来 HPMC において間葉系マーカーである α-SMA タンパクは約 30%発現していることから，上皮-間葉形質変換(epithelial to mesenchymal transition : EMT)を受けた細胞が混在することが示された(Fig. 4-2-2ab)。

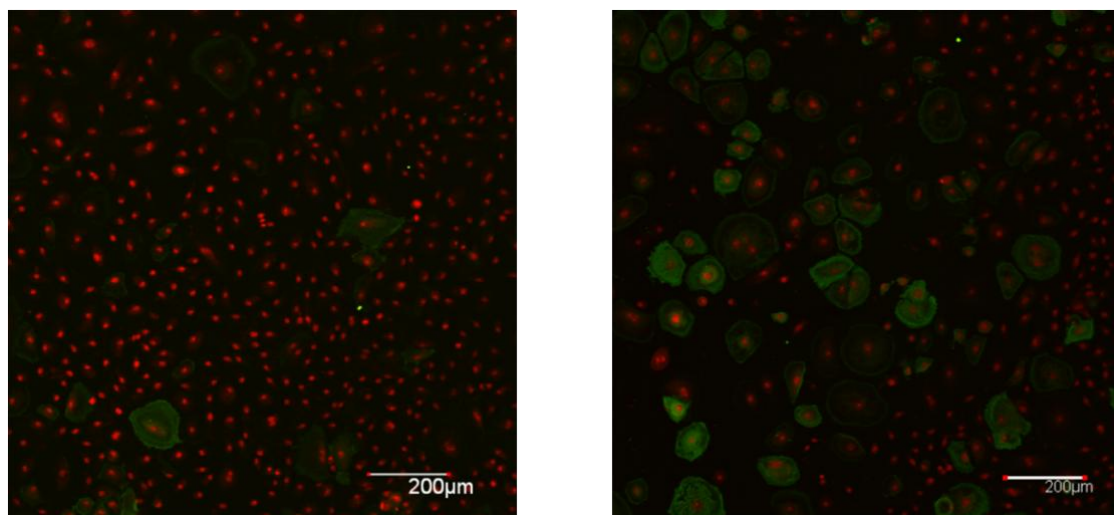



Fig. 4-2-2a. α-SMA タンパク染色画像 (左：低発現，右：高発現)

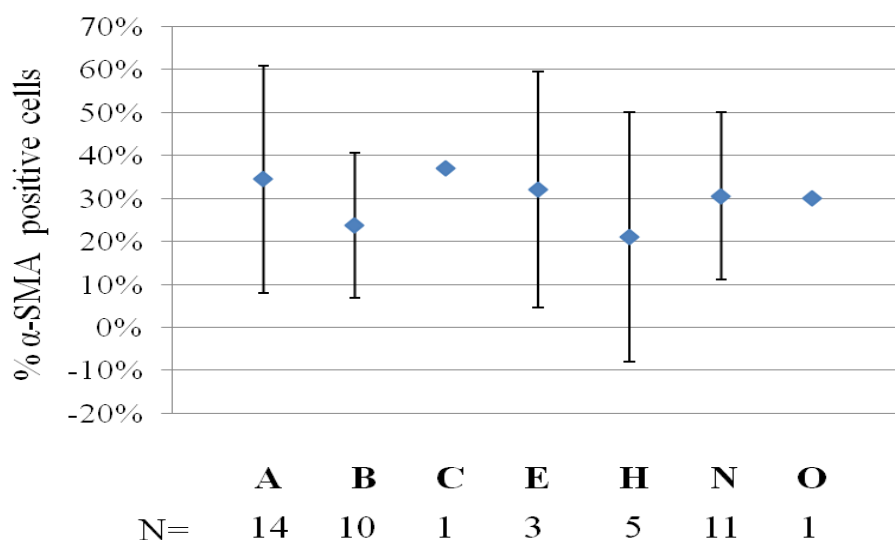



Fig. 4-2-2b. 患者別 α-SMA タンパク発現

4-2-3. Cytokeratin-18，α-SMA タンパク定量結果

Cytokeratin-18 及び α-SMA タンパク定量結果を Fig. 4-2-3 に示す。患者毎にそれぞれタンパク発現量は異なっているが，全ての患者においても α-SMA 発現が低い時 Cytokeratin-18 タンパク発現が高い。

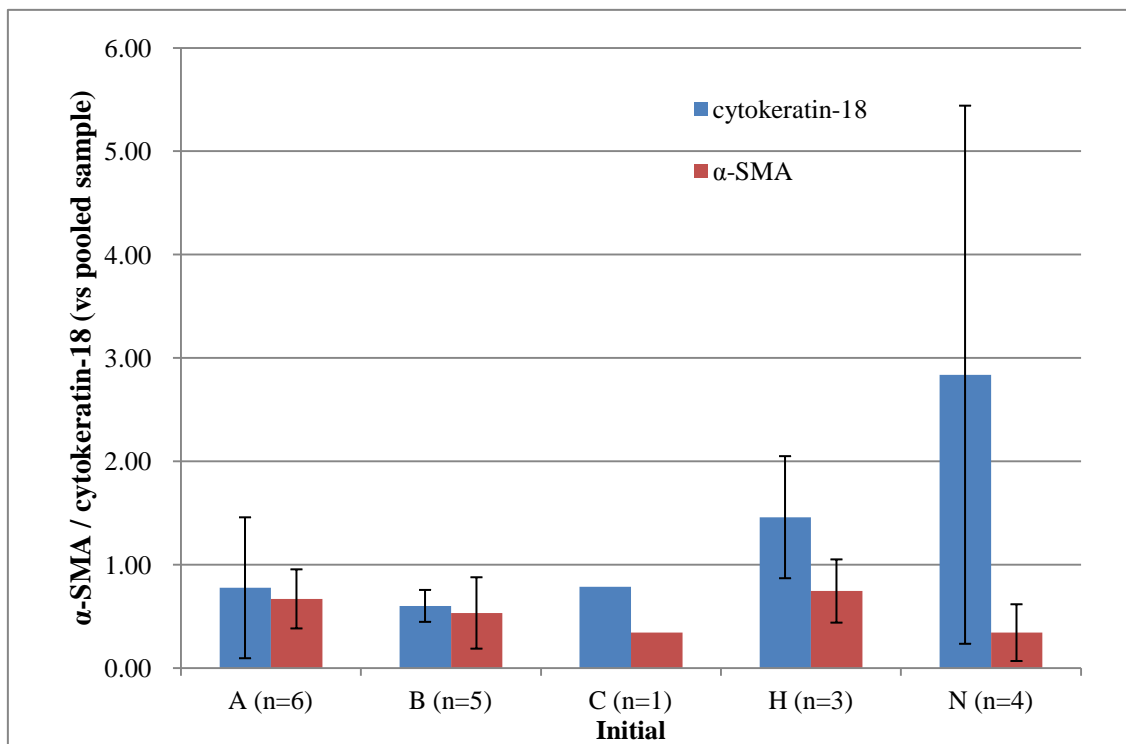



Fig. 4-2-3. Cytokeratin-18，α-SMA タンパク定量結果

4-3. 腹膜透析排液由来 HPMC の膜間電気抵抗(TER)測定

腹膜透析排液由来 HPMC の TER 測定値は 22±3 Ω・cm^2 であり，非腹膜透析患者組織由来 HPMC の 32±2 Ω･cm^2 と比較して約 35%低い値を示した(P<0.01)。一方，対照として測定した間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell : MSC)の 32±2 Ω・cm^2 と比較すると高い値を示した(P<0.01)(Fig. 4-3, Table. 2)。これは腹膜透析排液由来 HPMC は細胞間結合形成能が低下した細胞と細胞間結合を維持した細胞が混在していることを示唆する結果であると言える。

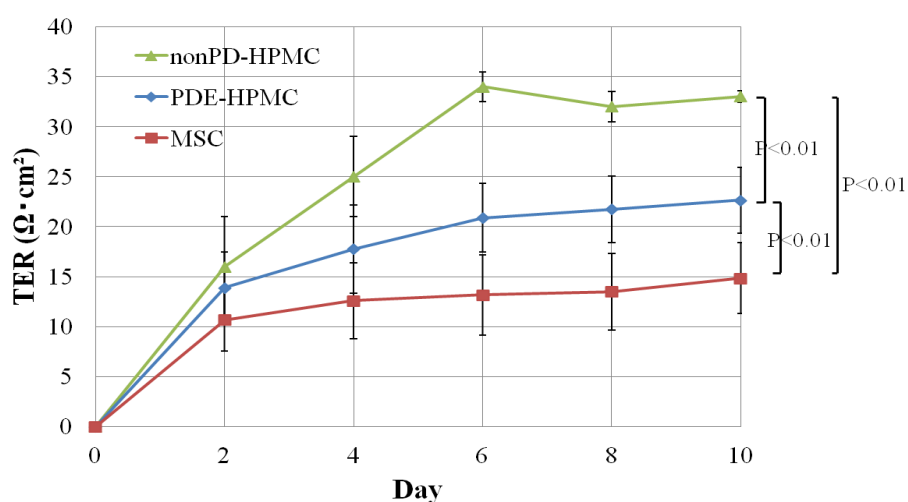



Fig. 4-3. 非透析患者組織由来 HPMC(nonPD-HPMC)，腹膜透析排液由来 HPMC(PDE-HPMC)，間葉系幹細胞(MSC)の膜間電気抵抗値

	非透析組織由来 HPMC(n=3)	排液由来 HPMC(n=25)	間葉系幹細胞(MSC) (n=5)
TER(Ω・cm^2)	32±2	22±3	15±4

Table. 2. 膜間電気抵抗値

4-4. 細胞増殖能，細胞面積

腹膜透析排液由来 HPMC の細胞増殖能は継代数 0 - 3 において有意に減少した(P<0.05)(Fig. 4-4-1)。また細胞面積は継代数 0 - 3 において有意に肥大することが示された(P<0.05)(Fig. 4-4-2)。正常 HPMC と比較すると早期の細胞機能劣化であり，腹膜透析排液由来 HPMC を透析排液から分離した時点で既に細胞の機能が低下していることが示唆された。

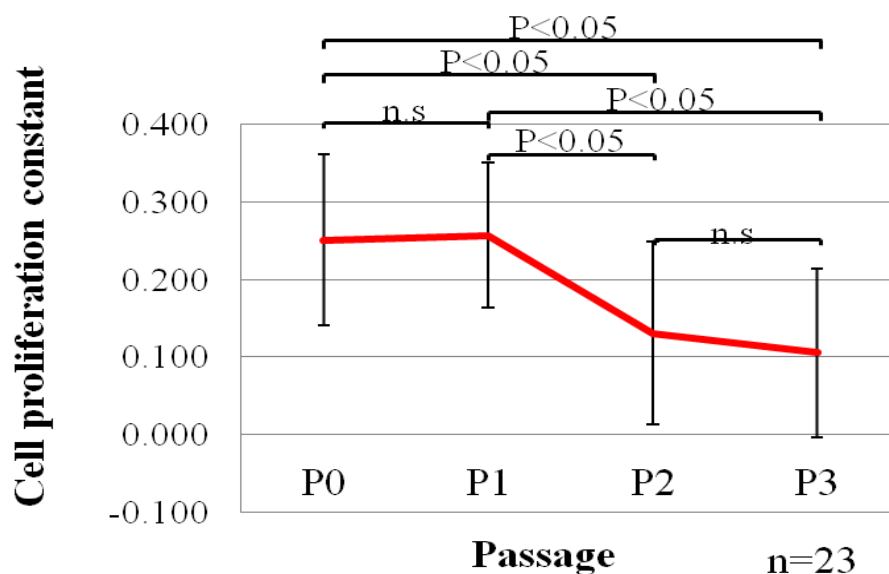



Fig. 4-4-1. 細胞増殖能の継代数における変化

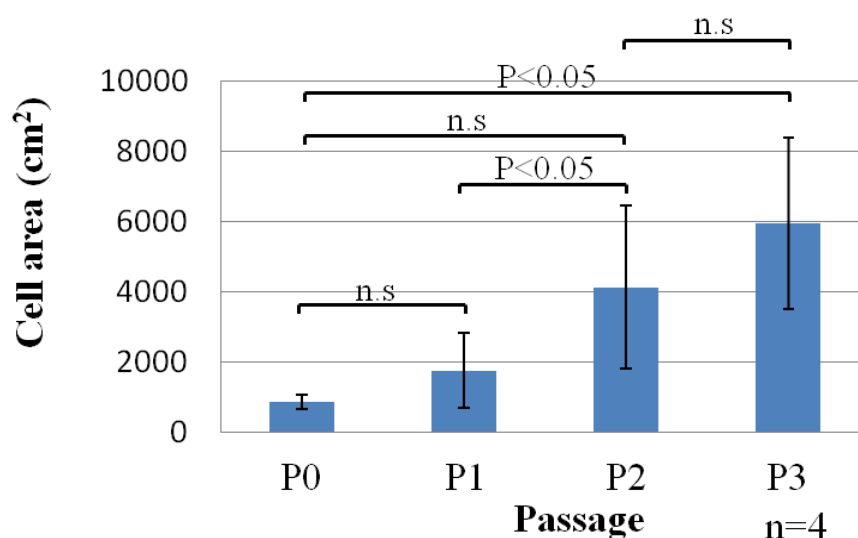



Fig. 4-4-2. 細胞面積の継代数における変化

4-5. 細胞老化

老化細胞において pH6.0 で特異的である老化関連 β-galactosidase (SA-β-Gal)は腹膜透析患者の年齢が増加するに従って発現率が増加した(P<0.05)(Fig. 4-5ab)。腹膜透析排液由来 HPMC には EMT を受けた細胞だけでなく，老化が進行した細胞の混在が示された。

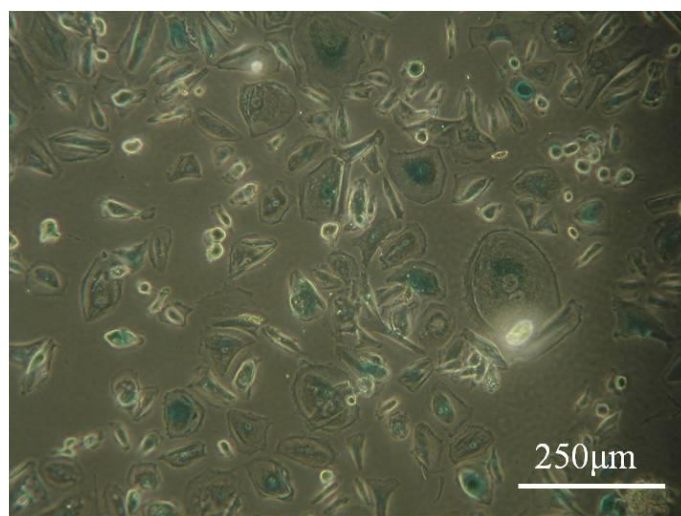



Fig. 4-5a. SA-β-Gal 染色画像

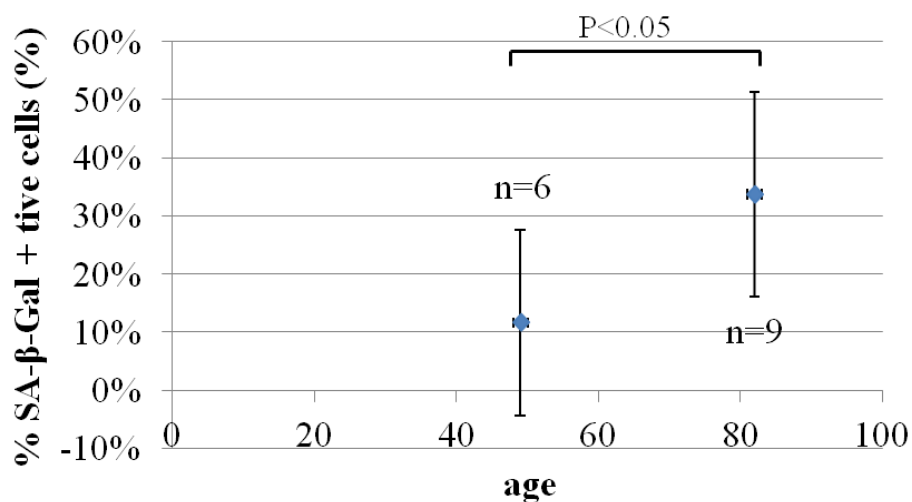



Fig. 4-5b. 患者年齢と老化細胞割合(SA-β-Gal 染色)

5. 考察

5-1. 腹膜透析排液由来細胞の細胞群

腹膜透析排液には透析期間によらず様々な細胞群が含まれており，その多くは白血球やマクロファージといった血球系の細胞である。透析排液に含まれる細胞の内，注目すべきは腹膜を構成する腹膜中皮細胞(HPMC)である。Betjes らの報告では透析排液中の HPMC の存在率は約 3%であり，本研究結果からも同程度の存在率であった[2]。血球系の細胞が含まれるのは，透析液を注入するためのカテーテルの留置や非生理的な透析液による炎症反応によるものであると考えられる。腹膜で炎症が起こると，白血球系細胞が炎症部位に遊走し，修復しようするため，白血球系細胞の増加は腹腔内炎症を懸念する必要があると言える。また赤血球細胞が含まれる場合，腹腔内で損傷し出血が認められる場合である。従って，血球系細胞が増加した場合は腹膜異常を懸念する必要があるといえる。

また HPMC が脱落する理由としては，代謝による脱落だけでなく，透析液の影響によるものと考えられる。浸透圧勾配形成の主成分として用いられている D-glucose は正常血漿中の glucose 濃度と比較して約 15-40 倍高く，この高濃度 glucose によって HPMC において TGF-β1, 単球走化性タンパク(MCP-1)や fibronectin 産生が増加することが示されている[43]。腹膜透析排液中に脱落した HPMC の多くは中皮細胞に特徴的な敷石状の形態を示すものが多いが，中には線維芽様に伸展した細胞や肥大した細胞の存在が報告されており，腹腔内で HPMC が上述したものから様々な影響を受けていることが容易に考えられる[44]。Yamamoto らは透析排液中に脱落した HPMC の大きさと透析期間から腹膜透析療法の中断基準を提案している[6]が，大きさだけでなく正常 HPMC と比較して，細胞機能が低下していることが考えられる。そこで，本研究では，細胞間結合形成能，EMT マーカーとしての α-SMA 発現，細胞老化に伴う増殖能，面積，SA-β-Gal 活性が腹膜透析による影響を顕著に表すものと考え，これらの細胞機能変化について評価した。

5-2. 腹膜透析排液由来 HPMC の特異タンパク発現の変化

腹膜透析排液由来接着細胞において中皮マーカーとしての Cytokeratin-18 陽性率は 98%であったことから透析排液に含まれる細胞群の内，接着や増殖できる細胞は中皮細胞であることが示された。血球系細胞は培地交換や継代培養を経る間に除去された結果であると言える。透析排液由来 HPMC は Cytokeratin-18 陽性であるものの，細胞によって陽性強度が異なる細胞が混在する。Cabrera らが大網由来 HPMC と比較して透析排液由来 HPMC の Cytokeratin-18 タンパク発現は減少し，さらに細胞形態が fibroblast-like な細胞はさらに減少していると報告している結果のように，透析排液由来 HPMC の Cytokeratin-18 発現にばらつきがあることが分かる[27]。Cytokeratin-18 と α-SMA は共に細胞間結合タンパクに結合したタンパクであり，細胞骨格タンパクである。

Cytokeratin-18 はデスモソーム，ヘミデスモソームに結合した中間径フィラメントタンパクであり Cytokeratin-8 と二量体を形成することでフィラメントを形成している。cytokeratin-8/18 フィラメント形成のためのリン酸化は protein kinase C, Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase, cAMP-dependent protein kinase によって仲介されることが Yano らによって示された[45]。protein kinase C と cAMP-dependent protein kinase はアミノ酸残基の serine をリン酸化するが，Ca^{2+}/calmodulin-depend protein kinase は serine 及び threonine をリン酸化することでフィラメント形成を促進している(Fig. 5-1)[45][46][47]。しかし，Strippoli らは TGF-β1 シグナルにおける ERK，NF-κB の活性化によって Cytokeratin タンパク発現が抑制されることを報告した[25]。

高濃度 glucose 下では HPMC から TGF-β1 が産生され(Fig. 5-2)[48]，オートクリン/パラクリンで作用し ERK/NF-κB が活性されていると考えられる。この経路は Ras，Raf，MEK，ERK を通る MAPK カスケードに加えて Smad，ILK，PI3K/Akt，NF-κB 経路を通り，さらに細胞間結合の消失によって，細胞間結合タンパクから遊離することで脱重合が促進され，その結果，Cytokeratin-18 タンパク発現が減少した細胞が混在する結果となったと考えられる(Fig. 5-3)。

10 20 30 40 50 60

MSFTTRSTFS TNYRSLGSVQ APSYGARPVS SAASVYAGAG GSGSRISVSR STSFRGGMGS

70 80 90 100 110 120

GGLATGIAGG LAGMGGIQNE KETMQSLNDR LASYLDRVRS LETENRRLES KIREHLEKKG

130 140 150 160 170 180

PQVRDWSHYF KIIEDLRAQI FANTVDNARI VLQIDNARLA ADDFRVKYET ELAMRQSVEN

190 200 210 220 230 240

DIHGLRKVID DTNITRLQLE TEIEALKEEL LFMKKNHEEE VKGLQAQIAS SGLTVEVDAP

250 260 270 280 290 300

KSQDLAKIMA DIRAQYDELA RKNREELDKY WSQQIEESTT VVTTQSAEVG AAETTLTELR

310 320 330 340 350 360

RTVQSLEIDL DSMRNLKASL ENSLREVEAR YALQMEQLNG ILLHLESELA QTRAEGQRQA

370 380 390 400 410 420

QEYEALLNIK VKLEAEIATY RRLLEDGEDF NLGDALDSSN SMQTIQKTTT RRIVDGKVVS

430

ETNDTKVLRH

Fig. 5-1. Cytpkeratin-18 アミノ酸配列とリン酸化部位[45][49]

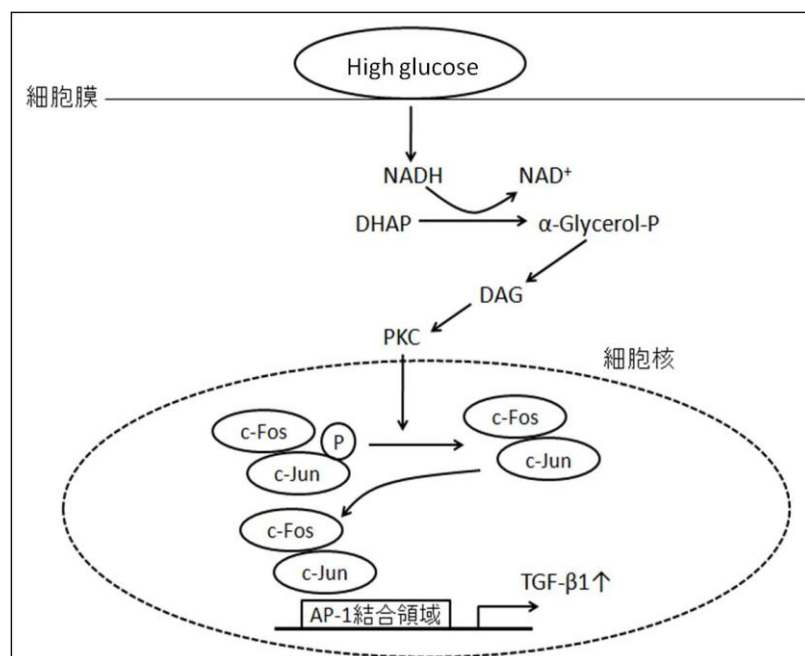



Fig. 5-2. 高濃度 glucose による TGF-β1 産生経路[48]

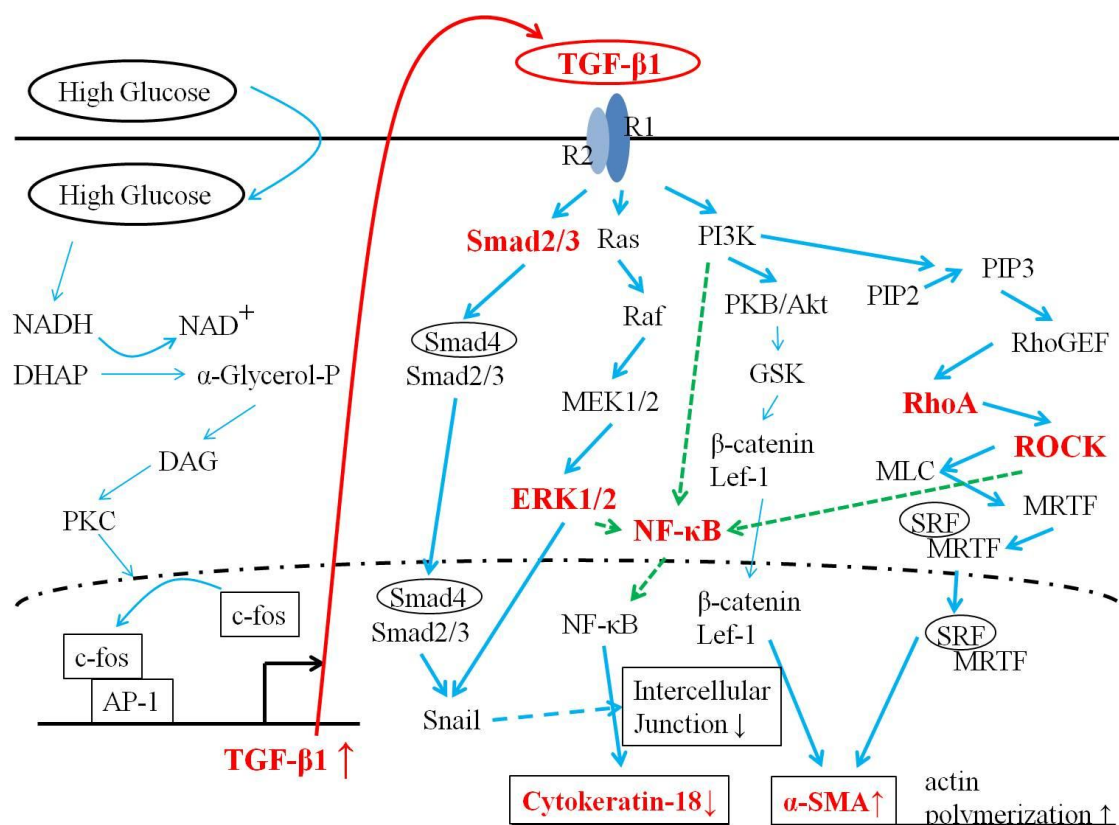



Fig. 5-3. 高濃度 glucose がもたらす Cytokeratin-18 及び
α-SMA タンパク発現変化のメカニズム[45][46][48][50][51][52][53]

また TGF-β1 によって細胞間結合の減少が引き起こされた結果，それと共に接着斑の形成に大きく関与している Focal Adhesion Kinase(FAK)，RhoA/ROCK，アクチン制御を行うモータータンパク質である Myosin light chain (MLC)のリン酸化を経てα-SMA タンパクを発現する(Fig. 5-3)。RhoA/ROCK 経路の活性化はストレスファイバー形成に関与しており，細胞形態の再構築を引き起こす[14][50][51]。さらに Cytokeratin-18 同様，細胞間結合の消失に伴ってアクチンが脱重合し細胞内に遊離し，RhoA/ROCK 経路の活性化によって再重合した結果，α-SMA ストレスファイバー形成を促進させたと考えられる。本研究室においても 10ng の TGF-β1 を大網由来正常 HPMC に曝露した時，有意にアドヘレンスジャンクションを形成する E-cadherin mRNA は減少し，転写因子 Snail mRNA，α-SMA タンパク発現が増加した(Fig. 5-4)[52]。

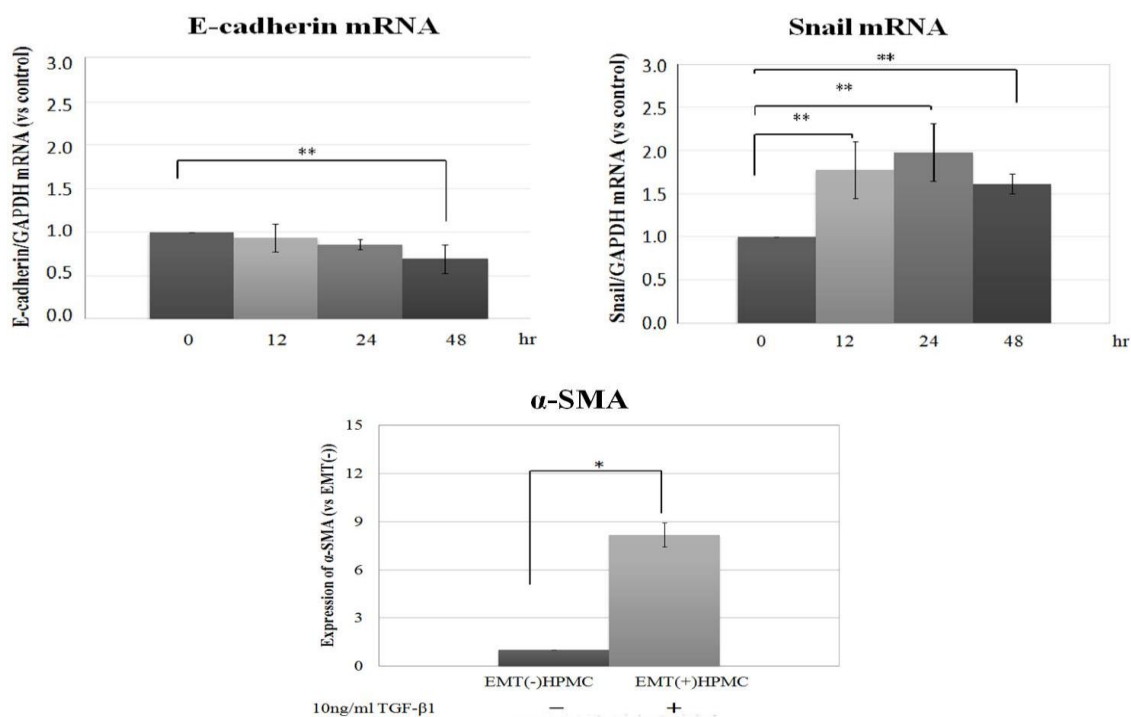



Fig. 5-4. 10ng/ml TGF-β1 曝露による E-cadherin mRNA，Snail mRNA
及び α-SMA タンパク発現量変化[52]

以上の考察をまとめると，

①腹膜透析液に含まれる高濃度 glucose によって，TGF-β1 産生させた。

②TGF-β1 によって ERK，NF-κB，RhoA/ROCK 経路が活性化された。

③細胞間結合の消失により，細胞間結合タンパクから Cytokeratin-18，アクチンフィラメントが脱重合した。

これらの結果, 腹膜透析排液由来 HPMC において Cytokeratin-18 の減少及び α-SMA の増加が起こったと考えられる。

5-3. 腹膜透析排液由来 HPMC の細胞間結合形成能低下メカニズム

腹膜から HPMC が腹膜透析中に脱落するにも，間質層へ浸潤するにも細胞間結合の消失が起こる。本研究では腹膜透析排液中に脱落した HPMC の細胞間結合形成能について膜間電気抵抗(TER)測定を用いて測定し，その結果から腹膜機能を評価することを試みた。腹膜透析排液由来 HPMC は非腹膜透析患者組織由来 HPMC と比較して約 34%低下が見られ，透析液に曝露され続けた結果であることが明確にされた。Ito らは正常大網由来 HPMC において高濃度 glucose によって tight junction タンパクである occludin，claudin-1，裏打ちタン

パクである ZO-1，β-catenin が減少することを報告した[53][54]。さらにこの時，グルコース濃度に比例して TGF-β1 産生濃度が増加した[53][54]。また腹膜透析排液由来 HPMC の TER 値は 22±3 Ω・cm^2 であったが，非腹膜透析患者組織由来 HPMC に 10 ng/ml TGF-β1 を曝露した時の TER 値が 19.8±0.7 Ω・cm^2 と近い値となり, TGF-βが細胞間結合形成能低下に対して直接影響があることが示唆された(Fig. 5-5)[35]。

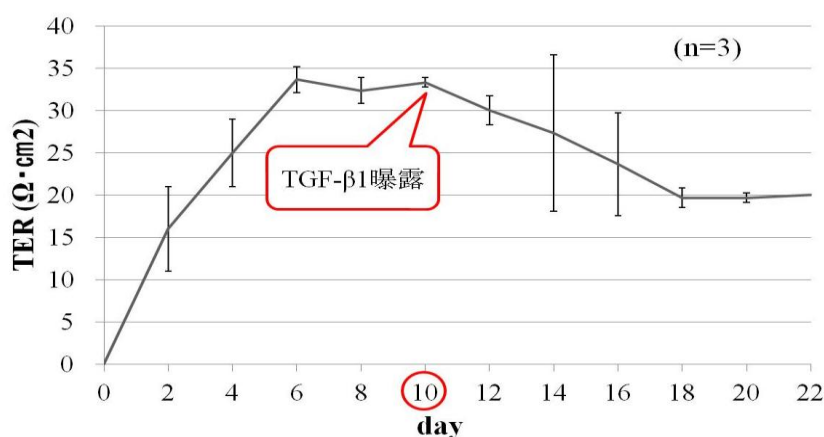



Fig. 5-5. 10ng TGF-β1 曝露による TER 値変化[35]

TGF-β1 は Smad 経路や MAPK カスケードを介して転写因子である Snail を発現させ, この Snail は E-cadherin を抑制する転写因子として知られているが, Li らは Snail shRNA によって E-cadherin だけでなく ZO-1 が抑制されなくなることを示した[55][56]。一方，興味深いことに細胞間結合消失を妨げると，α-SMA 発現が抑制されたという報告がある[56][57]。これらの結果を統合すると，まず細胞間結合に結合していたアクチンフィラメントが，細胞間結合が消失することで結合タンパクから脱重合して細胞質内に遊離し，次に RhoA/ROCK シグナルによって α-SMA プロモーターのうち CArG B 領域が Rho と反応しストレスファイバーとして再重合が促進された結果，α-SMA 発現が増加すると考えられる(Fig. 5-6) (Fig. 5-7)[14]。今回はデスモソーム，ヘミデスモソームについては調査していないが，タイトジャンクション，アドヘレンスジャンクションと同様に結合形成が消失し，中間径フィラメントの脱重合が起こっていると考えられる。本研究結果においても，TER 値と α-SMA タンパク発現においてある程度の逆相関性(R= -0.25)が見られた(Fig. 5-8)。

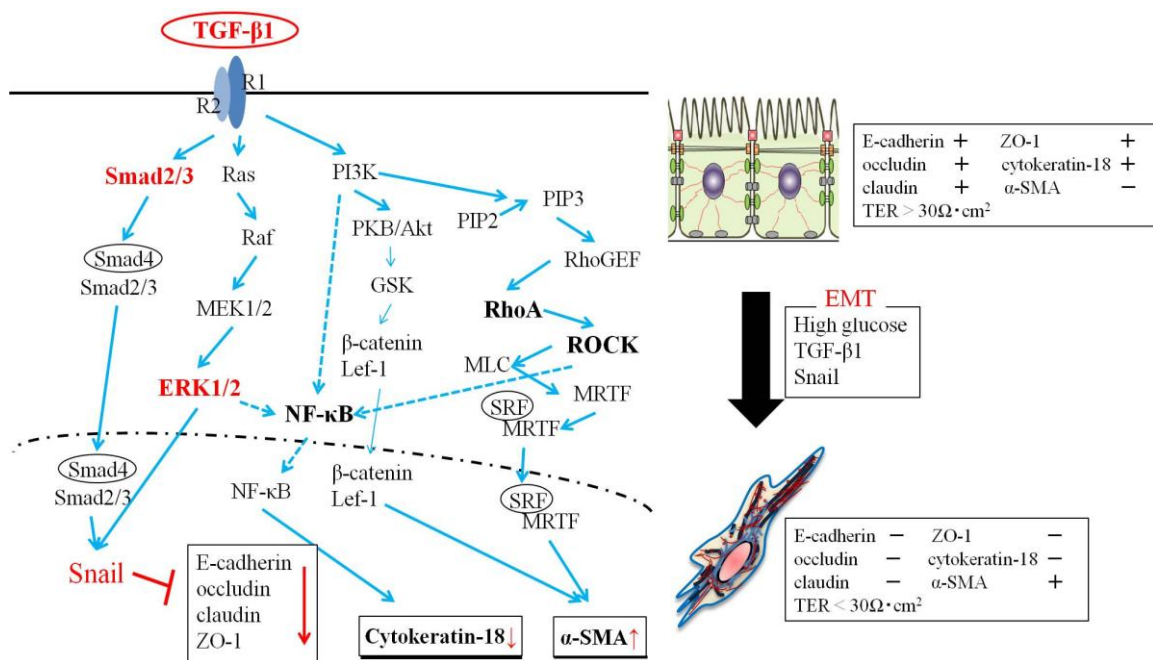



Fig. 5-6. 細胞間結合消失と細胞骨格再構築モデル[14][53][54][55][56]

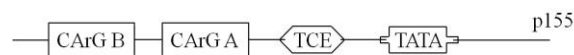



Fig. 5-7. α-SMA プロモーターの Rho 依存領域[14]

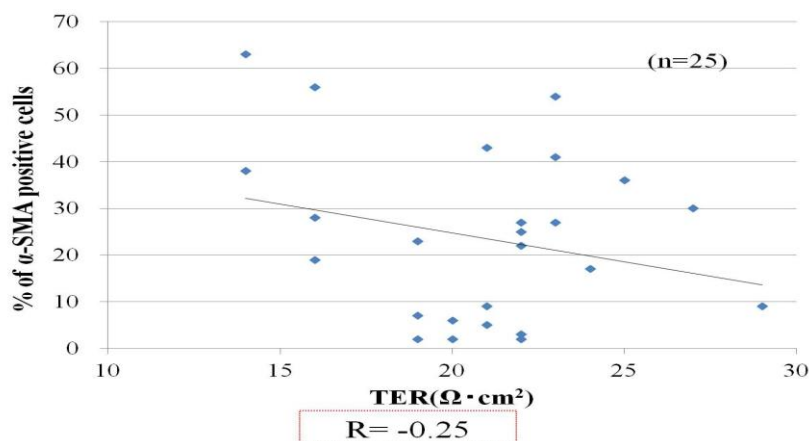



Fig. 5-8. α-SMA タンパク発現と TER 値の相関関係

つまり HPMC が高濃度 glucose によって産生される TGF-β1 によって EMT を受け，その結果細胞間結合の低下によって細胞間結合タンパクに結合していた細胞骨格を成すアクチンや中間径フィラメントが脱重合し，新たな細胞骨格を形成することで細胞形質を変化させていると考えられる。

5-4. 腹膜透析排液由来 HPMC の細胞老化の意義

腹膜透析排液由来 HPMC は敷石状形態を示す細胞が多いが，中には肥大化した細胞や増殖がみられない細胞が存在したことから細胞老化が進行していると考えた。本研究結果より，細胞増殖能が継代数 0-3 の早期で低下し，細胞面積も同じように肥大化することが示された。さらに SA-β-Gal 陽性細胞も確認されたことから，すでに腹膜透析排液由来 HPMC は細胞老化した細胞や細胞老化が進行している細胞が混在していることが示された。また患者年齢の増加によって SA-β-Gal 陽性率が増加し，これは加齢によって細胞の分裂回数を重ね，テロメア長が短小していることが考えられる。しかし，腹膜透析療法においては加齢による細胞の複製老化だけではなく，透析液の影響によるストレス誘導性早期老化も考慮する必要がある。

腹膜透析液の成分である高濃度 glucose は PKC や NADPH oxidase を活性化させて細胞内の活性酸素種(reactive oxygen species：ROS)を増加させることが知られている[42][58]。また高濃度 glucose によってミトコンドリア機能障害が引き起こされ細胞内 ROS が産生される[42][59][60]。さらに高濃度 glucose によって抗酸化物質である還元型グルタチオンやグルタチオンペルオキシダーゼが抑制されることが細胞内 ROS をさらに蓄積させる原因と考えられる[42]。ROS の蓄積によって DNA 損傷が DNA 修復速度を上回り，DNA 損傷が蓄積する。DNA 損傷が蓄積すると p53 タンパクが活性化され, p53 が活性化されると p21 が活性化され，細胞周期が停止することが知られている[61]。

細胞周期の調節にはサイクリン依存性キナーゼ(CDK)が関与しているが, その機能を阻害するインヒビターが存在し，構造や機能の違いから 2 つのグループに分類される。まず，Cip/Kip ファミリータンパク(p21，p27，p57)はほぼすべての CDK と結合し, そのリン酸化酵素としての働きを抑制する。また Ink4 ファミリータンパク(p16，p15，p18，p19)は CDK4 および CDK6 とのみ結合する。この内，p16 は CDK の活性を阻害し細胞周期を G1 期に静止させると考えられている。Ohtani らは，MAP キナーゼにより活性化される転写因子である Ets1 および Ets2 が p16 遺伝子の発現誘導に関与することを示したことから DNA 損傷とは異なる経路，すなわち腹膜透析療法においては TGF-β1 の発現増加によっても細胞老化が進行すること考えられる[62][63][64]。さらに老化細胞において TGF-β1 産生が増加するとの報告から, 老化細胞の割合が増加することによっても周囲の細胞は TGF-β1 の影響を受け, 細胞老化が進行するものと考えられる[37]。

これらの考察から，本研究結果における細胞老化の亢進(Fig. 4-5b)は複製老化だけでなく腹膜透析液に連続的に曝露されることによるストレス誘導性早

期老化によるものであると考えられる。

以上の考察をまとめると，腹膜透析排液由来 HPMC に老化細胞が含まれる理由として以下の 3 つが挙げられる。また細胞老化の機序を Fig. 5-9 に示す。
①細胞分裂によってテロメアが短小され複製老化が起こった。(年齢依存)
②高濃度 glucose によって活性酸素種が産生され，ミトコンドリアは機能障害を起こし，さらに活性酸素種が蓄積することで DNA は損傷を受ける。その結果, p53 が活性化され p21 の活性化につながり細胞周期が停止した。
③高濃度 glucose によって TGF-β1 が産生され，p16 が活性化され細胞周期が停止した。

老化した細胞が増殖することは腹膜の機能低下につながるため，ストレス誘導性早期老化を防ぐことが腹膜保護において重要な課題である。

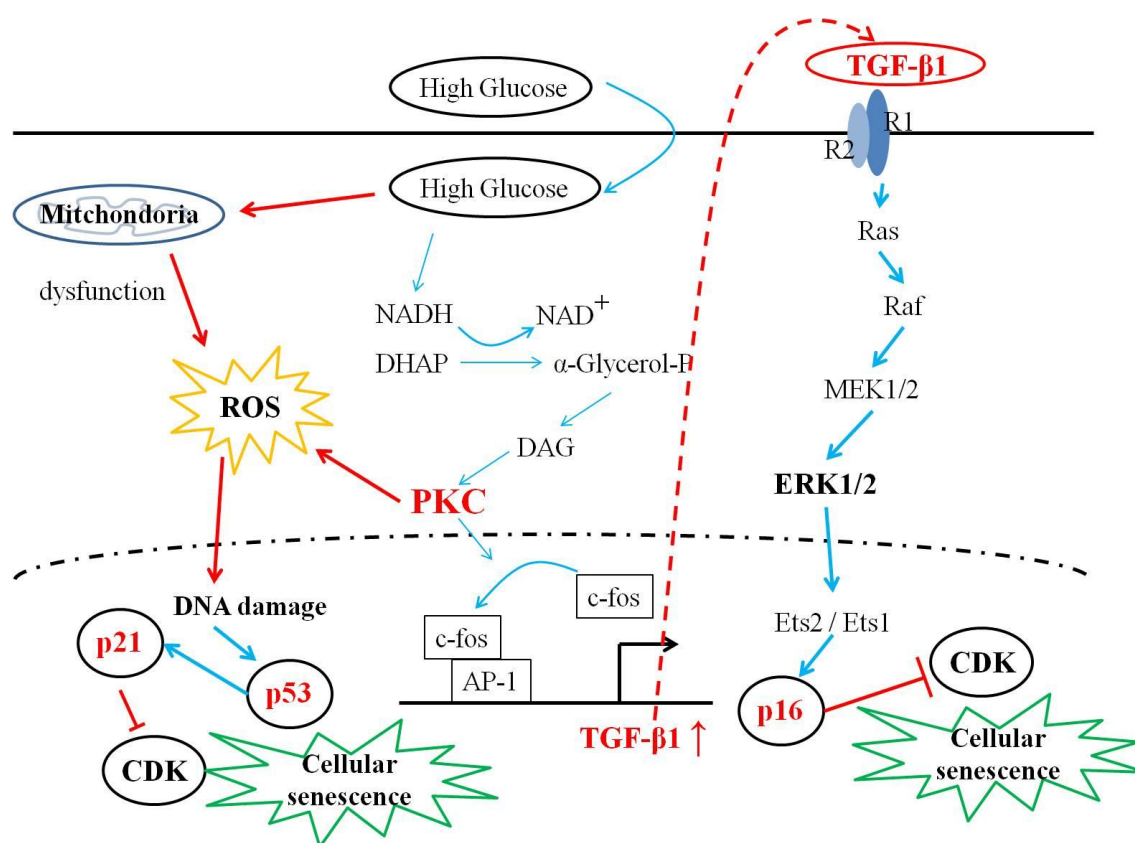



Fig. 5-9. ストレス誘導性早期老化メカニズム[42][58][59][60][61][62][63][64]

5-5. 臨床的意義

本研究結果から得られた細胞機能評価の中で注目すべき機能低下は，細胞間結合形成能の低下，α-SMA タンパク発現の増加，細胞老化の亢進である。本研究においては透析期間，除水量において有意な相関関係は見られなかった。しかし，長期に亙る透析では腹膜劣化が亢進するため，症例数の増加とともに今後，様々な臨床データと相関が得られるものと確信している。

まず，細胞間結合形成能の低下によって，腹膜において中皮細胞単層の物質透過制御能も低下すると考えられる。物質透過が促進されると透析液のグルコースが体内へと移動しやすくなり濃度勾配形成が短時間しか出来ず，除水不足や老廃物の除去不足に陥ると考えられる。従って，細胞間結合能と除水量および D/P-Cr などで相関関係が求められると考えられる。

次に，Cytokeratin-18 発現の低下，及び α-SMA 発現の増加に伴う EMT の亢進は HPMC に浸潤能の獲得やコラーゲンなどの細胞外基質産生能を与え，腹膜の肥厚化や硬質化させる結果に繋がると考えられる。今後はタンパク量を定量することで細胞機能評価の精度を向上させる必要があるといえる。

最後に，細胞老化の亢進は細胞増殖の低下をはじめ，様々な細胞機能の低下をもたらす為，腹膜損傷部位の修復能の低下に繋がると考えられる。

本研究の利点である透析排液由来細胞の細胞機能評価は無侵襲的であり，腹膜の状態を反映し，腹膜機能の診断に応用が期待される。さらに，腹膜機能を低下させる細胞機能低下について解明することで，新たな治療方法の確立に貢献できると考えている。

5-6. 総括

本研究において達成できた事は以下の通りである。

①腹膜透析排液からの HPMC の分離

②腹膜透析排液由来 HPMC の特異タンパク発現及び細胞間結合の評価

③腹膜透析排液由来 HPMC に含まれる細胞の解明

(正常 HPMC，EMT-HPMC，老化 HPMC)

本研究により腹膜透析排液由来細胞は HPMC であることが証明されたが，腹膜透析によって α-SMA 発現の増加や細胞間結合形成の低下(EMT の亢進)，細胞老化の亢進が引き起こされることが示された。これらの細胞機能の低下は腹膜の状態を反映すると考えられ，腹膜の無侵襲診断としての応用が期待される。また腹膜透析排液中には正常な細胞の存在が認められたことから，腹膜再生治療の細胞源としての応用も期待でき，また HPMC を用いた研究にも多大な貢献をもたらす結果であると言える。

6. 結論

本研究より以下のことが導き出せた。

① 腹膜透析排液由来 HPMC には以下の 3 種類が含まれることが示された。

(1) 正常 HPMC・・・敷石上形態，α-SMA 低発現，細胞間結合形成能維持，SA-β-Gal 陰性

(2) EMT-HPMC・・・線維芽様形態，α-SMA 高発現，細胞間結合形成能低下

(3) 老化-HPMC・・・SA-β-Gal 陽性

これらの細胞が腹膜透析排液由来 HPMC には存在し，各細胞群の割合によって腹膜状態の変化が反映されるものと考えられる。

② 細胞間結合形成能(TER 測定)と間葉系マーカー(α-SMA)陽性率は逆相関性を示した。

TER 測定結果と α-SMA 陽性率にはある程度の逆相関性(R= -0.25)が求められたことから，EMT を受けた HPMC の細胞間結合形成能の低下が示された。

また細胞間結合を維持することの重要性が示唆された。

③ 細胞機能評価が腹膜機能診断の手段の一つになりうる。

本研究において細胞機能として，接着率，増殖能，特異タンパク発現，細胞間結合形成能，細胞老化について評価を行なったが，患者・サンプル毎に異なることが示された。特に細胞間結合と α-SMA 陽性率で逆相関性が見られたように細胞機能評価が腹膜機能診断として応用出来る可能性が示唆された。

今後，腹膜機能の無侵襲診断へ応用するためには細胞機能評価だけではなく臨床データとの相関を精査する必要がある。また腹膜透析排液由来 HPMC には正常 HPMC の存在が確認されたことから，診断への応用だけではなく，腹膜再生治療の細胞源としての応用も期待できる結果となった。

7. 今後の展望

・腹膜機能の無侵襲診断法としての確立

今回は腹膜透析排液由来HPMCの細胞機能評価に関する相関関係の調査のみであったが，臨床現場においては患者の年齢，透析期間に加え腹膜透析排液の様々な因子に着目した臨床データが集積している。これらの臨床データと本研究の細胞機能評価との関係を精査することによって，新たなマーカーによる診断基準の提案や腹膜温存状態を評価するための無侵襲診断法として確立させることを目指す。

・腹膜透析排液由来 HPMC の細胞源としての利用

本研究より腹膜透析排液には細胞機能が低下した HPMC だけでなく，正常なHPMCの存在が示唆された。正常なHPMCを早期に分離・培養することで細胞源として利用出来ると考えられる。しかし，正常な HPMC だけを分離することは困難であるため，細胞密度や細胞外基質との親和性といった特性を利用して分離する方法の確立が必要である。また，HPMC は in vitro 培養において長期培養も困難であるため，細胞機能を維持したまま長期培養出来る新たな細胞培養法の確立も必要である。細胞分離・培養方法を確立させ，腹膜透析排液由来 HPMC を様々な用途に合う細胞源として利用することを目指す。

・HPMC の脱落メカニズムの解明

非生理的な透析液によって細胞は影響を受け，腹膜透析排液中に脱落したHPMC は細胞機能が低下していることが示された。しかし，腹膜から HPMC が脱落する原因は代謝や形質変換などが原因と考えられるが詳細な原因は未だ分かっていない。腹膜から HPMC が脱落するメカニズムを理解することは透析方法や透析液の改善ためにつながると考えられる。

透析環境を模倣した実験系を作成し，HPMC の挙動を調査し，添加実験などによって細胞にかかるストレスの軽減をさせることを目指す。

8. 参考文献

1 平原 一郎, 他. 中皮細胞の epithelial-to-mesenchymal transition(EMT)による腹膜肥厚の促進. 腹膜透析 2007 東京医学社

2 Betjes MGH, et al. The Mesothelial Cells in CAPD Effluent and Their Relation to Peritonitis Incidence. *Peritoneal Dialysis International* 1991; 11: 22-26

3 Castro MF, et al. CELL POPULATIONS PRESENT IN THE NOCTURNAL PERITONEAL EFFLUENT OFPATIENTS ON CONTINUOUS AMBULATORY PERITONEAL DIAL YSIS AND THEIR RELATIONSHIP WITH PERITONEAL FUNCTION AND INCIDENCE OF PERITONITIS. *Perit Dial Int* 1994; 14: 265-270

4 Twardowski ZJ, et al. Peritoneal equilibration test. *Perit Dial Bull 1987;* 7: 138-147

5 川口 良人, 宇田 有季, 佐中 孜 著. 腹膜透析入門/東京医学社 2008

6 Yamamoto T, et al. THE ROLE OF PERITONEAL LAVAGE AND THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MESOTHELIAL CELL AREA IN PREVENTING ENCAPSULATING PERITONEAL SCLEROSIS. *Perit Dial Int* 2010*;* 30: 343-352

7 Jones S, et al. Bicarbonate/lactate-based peritoneal dialysis solution increasescancer antigen 125 and decreases hyaluronic acid levels. *Kidney Int* 2001; 59(4): 1529-38

8 Hirahara I, et al. The potential of matrix metalloproteinase-2 as a marker of peritoneal injury, increased solute transport, or progression to encapsulating peritoneal sclerosis during peritoneal dialysis--a multicentre study in Japan. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(2): 560-7

9 Hirahara I, et al. Matrix metalloproteinase levels in the drained dialysate reflect the peritoneal solute transport rate: a multicentre study in Japan. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(5): 1695-701

10 Selgas R, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: ii2-ii76

11 山口 陽平 著. Snail mRNA と Epithelial to mesenchymal Transition(EMT). 平成18 年度三重大学工学部分子素材工学科卒業論文 2006

12 Zeisberg M and Kalluri R:The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 2004; 82: 175-181

13 Zeisberg M, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to -mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003; 9: 964-968

14 Maszi A, et al. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F911-F924

15 Tian Y.C, et al. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2367-2377

16 石垣 達也 著. 三次元細胞遊走モデルを用いた腹膜中皮細胞の epithelial to mesenchymal transition(EMT)による浸潤メカニズムの解明. 平成 19 年度三重大学大学院工学研究科博士前期過程分子素材工学専攻修士論文 2007

17 Oldfield M.D, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* 2001; 108: 1853-1863

18 An S. De Vriese, et al. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:2549-2555

19 田宮信雄、村松正実、八木達彦、吉田浩、遠藤斗志也 ヴォート生化学(上) 第 3 版/東京化学同人(2005)

20 Yanez-Mo M, et al. Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403-413

21 An Hang Yang, et al. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 2003;63:1530-1539

22 Mei-Jen, et al. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2008; 99(5): 905-13

23 門脇孝:細胞増殖因子の最前線 基礎から臨床への up-to-date な分子医学/羊土社(1993)

24 Jean Paul Thiery, et al. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2006; 7: 131-142

25 Strippoli R, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF-kappaB/Snail1 pathway. *Dis Model Mech* 2008; 1(4-5): 264-74

26 Luiz S. Aroeira et al. Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients:Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2004-2013

27 López-Cabrera M, Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as

an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* 2006; 26(1): 26-34

28 Bruce A, Alexander J, Julian L, et al, MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, (Newton Press, 2004)

29 片方陽太郎, 蛋白質 核酸 酵素. 1993; 38(16): 2711-2722

30 日下部岳宏, 佐藤矩行. 蛋白質 核酸 酵素. 1993; 38(4): 721-730

31 文部科学省 HP ターゲットタンパク研究プログラム : http://www.tanpaku.org/tp_fundamental_biology/07.php

32 津留 慎吾 著. 細胞の足場材料と細胞間結合についての基礎的研究. 平成 20 年度三重大学大学院工学研究科博士前期過程分子素材工学専攻修士論文 2008

33 Kaneda K, Miyamoto K, Nomura S, et al. Intercellular localization of occludins and ZO-1 sa a solute transport barrier of the mesothelial monolayer. JAO. 2006; 9: 241-250

34 Horiuchi T, Matsunaga K, Banno M, et al. HPMCs Induce greater intercellular delocalization of tight junction-assosiated proteins due to a higher susceptibility to H_2O_2 compared with HUVECs. *Perit Dial Int*. 2009; 29: 217-226

35 東 洋 著. 形質変換に伴う細胞極性変化の膜間電気抵抗測定. 平成 21 年度三重大学工学部分子素材工学科卒業論文 2010

36 原 拓也 著. 単層腹膜上皮細胞の細胞間結合に関する基礎研究. 平成 22 年度三重大学工学部分子素材工学科卒業論文 2011

37 杉本昌隆, 高橋暁子, 原英二. 蛋白質 核酸 酵素 2006; 51(1): 10-17

38 Dimri GP, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(20): 9363-7

39 五十嵐和彦, 土肥由裕. 生化学. 2009; 81(6): 502-510

40 Parrinello S, et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003; 5(8): 741-7

41 Ksiazek K, et al. Oxidative stress-mediated early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(4): 460-467

42 Ksiazek K, et al. Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 636-641

43 Ito T, et al. Peritoneal damage by peritoneal dialysis solutions. *Clin Exp Nephrol* 2008 ; 12: 243-249

44 Schilte MN, et al. Factors contributing to peritoneal tissue remodeling in peritoneal

dialysis. *Perito Dial Int* 2009; 29: 605-617
45 Yano T, et al. Phosphorylation of keratin intermediate filaments by protein kinase C, by calmodulin-dependent protein kinase and by CAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 1991; 197: 281 -290
46 Omary MB, et al. PKCE-Related Kinase Associates with and Phosphorylates Cytokeratin 8 and 18. *The Journal of Cell Biology* 1992; 117: 583-593
47 Ku NO, Identification of the Major Physiologic Phosphorylation Site of Human Keratin 18: Potential Kinases and a Role in Filament Reorganization. *J Cell Biol* 1994; 127(1): 161–171
48 Ha H, et al. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2001; 59: 463-47
49 UniProtKB/Swiss-Prot : http://www.uniprot.org/uniprot/P05783
50 Bhowmick NA, et al. Transforming Growth Factor-β1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Mol Biol Cell* 2001; 12:27-36
51 Fan L, et al. Cell Contact–dependent Regulation of Epithelial–Myofibroblast Transition via the Rho-Rho Kinase-Phospho-Myosin Pathway. *Mol Biol Cell* 2007; 18(3): 1083-97
52 Yamaguchi Y, et al. THREE-DIMENSIONAL INVASION OF EPITHELIAL–MESENCHYMAL TRANSITION–POSITIVE HUMAN PERITONEAL MESO-THELIAL CELLS INTO COLLAGEN GEL IS PROMOTED BY THE CONCENTRATION GRADIENT OF FIBRONECTIN. *Perito Dial Int* 2011; 31(4): 477-85
53 Ito T, et al. Effect of Glucose on Intercellular Junctions of Cultured Human Peritoneal Mesothelial Cells. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1969–1979
54 Ito T, et al. Effect of Glucose Polymer on the Intercellular Junctions of Cultured Human Peritoneal Mesothelial Cells. *Nephron Clin Pract* 2003; 93: c97–c105
55 Saito T, et al. E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* 2004; 23(53): 8629-38
56 Li H, et al. Snail Involves in the Transforming Growth Factor b1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelial Cells. *PLoS One* 2011; 6(8): e23322
57 Loureiro J,et al. BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. *Nephrol Dial Transplant* 2010: 1-11

58 Lee HB, et al. Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2004; 65: 1170–1179
59 Książek K, et al. Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 362: 707–711
60 Książek K, et al. Mitochondrial dysfunction is a possible cause of accelerated senescence of mesothelial cells exposed to high glucose. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 366: 793‐799
61 Madan E, et al. Regulation of glucose metabolism by p53: Emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget* 2011; 2: 948 – 957
62 Ohtani N, et al. Opposingeffectsof EtsandIdproteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 2001; 409: 1067-1070
63 Takahashi A, et al. Mitogenic signalling and the p16INK4a–Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2006; 8(11): 1291-7
64 Takeuchi S, et al. Intrinsic Cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the Onset of Cellular Senescence and Tumor Suppression In vivo. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9381-90

9. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究及び研究生活全般において、適切かつ懇切なご指導を賜り、公私において非常にお世話になりました三重大学工学部分子素材工学科生体材料化学研究室の堀内 孝教授、宮本 啓一准教授、事務員の村上 節子様に深く感謝致します。

本研究を行う上で必要な大網組織や腹膜透析排液を提供していただいた患者様、そしてそこに関わる三重大学医学部の諸先生方に深く感謝致します。

そして、3 年間研究室の先輩として熱心に研究に取り組む姿を示し，数多くの助言をして下さった D2　水谷　直紀先輩を始めとする諸先輩方，また大学院生活の上で公私ともに，刺激し合い，励まし合い，，共に成長した同期の大友　佳子さん，加藤　真司君，熊澤　雄基君，佐々木　剛君，野口　寛之君，堀井　貴司君に深く感謝を致します。

また M1　神谷　歩君，境　淳志君，田野　裕美さん，中村　雅広君，丹羽一喜君，1 年間だけではありましたが B4　伊藤　直人君，北村　早希さん，影山　聡志君，小山　直紀君，財部　龍太郎君，中町　信敏君，長谷川　まりなさんのおかげで毎日研究室生活を楽しく過ごすことが出来ました。感謝とともに後輩の皆さんそれぞれの今後の成長を期待しています。

最後に、研究室に配属されてから実験や研究室生活において私を指導し成長させてくれた佐野　晃史先輩を始め，同じ研究テーマに取り組み日々共に研究に勤しんだ M1　阿部　功児君，葛本　智淳君，原　拓也君，B4　清水　佑典君，叢　秀娜さんには感謝の意が絶えません。心より深く感謝致します。

生体材料化学研究室で研究だけでなく，アメリカ留学という人生において貴重な経験や学会発表といった今後の糧となる多くを経験させて頂きました。素晴らしい研究室として今後も発展することを心より願っております。

10. Appendix

A-1. 細胞培養プロトコル

A-1-1. 培地調整
A-1-2. 腹膜透析排液由来細胞の分離
A-1-3. 初代培養
A-1-4. 継代培養

A-2. 免疫化学蛍光染色

A-3. 膜間電気抵抗(TER)測定

A-4. Western Blotting 法

A-5. 細胞面積測定

A-6. SA-β-Gal 染色

B-1. 滅菌について

B-4. 本研究で使用した試薬について

C-1. 腹膜透析排液サンプル結果まとめ (#1~#57)

A-1. 細胞培養プロトコル

A-1-1. 培地調整

<使用機器・器具・試薬>

- 50ml シリンジ(TERUMO®)
- 30ml アシストチューブ(アシスト/Cat.No.60.543.001S)
- 注射針
- PH メーター
- Millex-GV(MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22µm)
- Strivex GS(MILLIPORE/Cat.No.SVGSB1010/膜孔径 0.22µm)
- STERICUP™ フィルター(MILLIPORE/Cat.No.SCGVU05RE)
- 15ml 遠沈管
- 0.5ml アシストチューブ(アシスト/Cat.No.72.699 S)
- Medium 199(SIGMA/Cat.No.M2154)
- Penicillin streptomycin(SIGMA/Cat.No.P-0781)
- Insulin Transferin Selenate(SIGMA/Cat.No.I-1844)
- L-Glutamine(SIGMA/Cat.No.G-7513)
- Hydrocortisone(SIGMA/Cat.No.H-0888)
- 1N NAOH aq
- 1N HCL aq(080-08065/Wako)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)
- Diethylpyrocarbonate

<各溶液調整>

○ 培地調整

- ITS（Insulin Transferin Selenate）

  ITS（パウダー状）の瓶に DEPC 処理水 50 ml を入れ撹拌し、1.5ml アシストチューブに 500µl ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。

- L-G（L-Glutamine）

  15 ml 遠沈管に 5 ml ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。

- P-S（Penicillin-Streptomycin Solution）

  5 ml アシストチューブに 5 ml ずつ分注し、冷凍庫にて－20℃で保存した。

- HC（Hydrocortisone）

  HC 4 mg を 2 ml の無水 ethanol で溶解し、DEPC 処理水 2 ml を加えて濾

過した。0.5 ml アシストチューブに 200 µl ずつ分注し、室温で保存した。

[操作]

① L-G、P-S 各 5 ml を一本のチューブにまとめ、L-G,HC をそれぞれ 50 µl ずつ加えた。

② 上記のサプリメントを、10 ml シリンジ（TERUMO®）を用いて Millex-GV を通してフィルター滅菌し、Medium-199 に添加した。

＊pH を調整する場合

③ 培地の pH を調整した。また、pH は 7.2 に調整した。

※体内の pH は 7.4 である。

※pH を 7.2 にするのは、フィルター滅菌後に pH の値がおよそ 0.2 大きくなるためである。1N-HCl aq や 1N-NaOH aq を使用して pH を調整した。

○ Fetal bovine serum（牛胎児血清）の不活性化、分注、保存

[操作]

① 凍結の状態で送られてきた FBS は 37℃で溶かした。溶かし終わったら数回振り、55～56℃で、時折振り混ぜながら 30 分間温めた（不活性化）。

② 50 ml のシリンジ（TERUMO®）で吸い取り、Strivex GS、もしくは、Stericup フィルターユニットにてフィルター滅菌し、30 ml アシストチューブに 25 ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。

③ 冷凍庫（－20℃）で保存した。

○ Trypsin-EDTA solution (10x)

[操作]

① 納品後、冷凍保存（－20℃以下）した。

② 37℃で解凍し、5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、－20℃にて保存した。

○ 滅菌水の作製

[操作]

① Milli-Q 水又は蒸留水（用途に応じて）滅菌瓶に小分けし、高圧蒸気滅菌（121℃、20 分）した。

② 滅菌後、栓をしたまま棚に保管した。

○ DEPC 処理水の作製

[操作]

① メディウムビンを Milli-Q 水で 2 回洗浄し、Milli-Q 水をメディウムビンに入れた。

② Milli-Q 水の体積に対して 0.1％の DEPC（Diethylpyrocarbonate）を加え（500ｍｌのミリ Q 水に対してならば DEPC を 500µl）、蓋をきっちり締めてよ

く振り混ぜた。

※ DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。

③ そのまま 37℃のインキュベーター内に入れ、2 時間加温した。加温の際には 30 分に 1 回振り混ぜること。

※ 振り混ぜることでビンの蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。

④ ビンの蓋を十分緩めて、121℃／40 分（1 本あたり 500m l ならば）オートクレーブにかけた。

※ オートクレーブをすることにより DEPC を除去する。オートクレーブ後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度オートクレーブにかける。

※ DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸うことのないように気を付けること。また、オートクレーブに溜まった水は気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるので、その排水は責任を持って処理すること（大量の水と共に排水口へ流す）。

A-1-2.腹膜透析排液由来細胞の分離

〈使用機器・器具・試薬〉

- CO_2 インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- 遠心分離機(TOMY　RX-200　生命科学研究支援センター)
- 恒温槽
- Vortex
- 遠心ボトル(TA-18)
- 15ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- 50ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- 遠沈管立て
- 10ml ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ピペッター
- φ35mm シャーレ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80240)
- パスツールピペット
- スパチュラ
- 血球計算盤
- カウンター
- Medium-199(SIGMA/Cat.No.M2154)
- PBS(SIGMA/D8537)

- EDTA(SIGMA/T4174)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

〈組織の入手方法〉

本研究で用いた腹膜透析排液から分離した HPMC は、予め本学医学部倫理委員会にて患者の腹膜透析排液の採取について承認を得ており、informed consent を得た三重大学病院透析室における患者より頂いた透析排液である。基本的に週 1 回排液を頂き、その都度サンプル番号(#数字)をつけた。

〈前日の準備〉

[操作]

① 予め、遠心ボトル、ハサミ、クランプをオートクレーブにかけて器具滅菌をしておく。

② 0.9%　NaCl　Solution を調整し、5.0mmol EDTA / 5ml NaCl Solution を濾過滅菌し、シリンジで吸引した後、アルミホイルで巻いてベンチ内で保存する。

〈細胞分離〉

[操作]

① 調整して濾過滅菌した 5.0mmol EDTA/5ml NaCl Solution を腹膜透析排液バッグのカテーテルからシリンジを用いて無菌的に加えた。

② 5.0mmol EDTA/5ml NaCl Solution が排液全体に分散するように左右に振り、よく混ぜた。

③ 秤をエタノールでよく拭いた後、ベンチ内に入れ遠心ボトルに分注しながら排液の総重量を求めた。

④ 分注した遠心ボトルを 25℃・800 rpm (50 G) で 10 分間遠心分離した。

⑤ 各遠心ボトルの上澄みを捨て約 30 ml にし、50ml 遠心管に分注した。

⑥ 各遠沈管を 750 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを捨てて 10% FBS / M199 培地を加えて 1ml の細胞懸濁液にした。

⑦ 細胞懸濁液から 7μl 取り血球計算盤で細胞をカウントする。細胞数が多い場合は、細胞懸濁液を調整した。

⑧ 10% FBS/M199 培地を 1ml 入れて 37℃・5%CO_2 でプレインキュベートしておいた接着用 φ35 シャーレに細胞を播種した。

⑨ 翌日、PBS で洗浄後に 10% FBS/M199 培地を交換した。

培地は 3 日に 1 回交換した。

A-1-3.初代培養

<使用機器・器具・試薬>

- CO_2インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- 攪拌遠心機(LABINCO/2790001)
- ウォーターバス
- Vortex
- 手術器具一式（滅菌済）
- 25cm^{2}培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21050)
- 15ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- 50ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- 遠沈管立て
- 10ml ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ピペッター
- タイマー
- Medium-199(SIGMA/M2154)
- PBS(SIGMA/D8537)
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION(10x)(SIGMA/T4174)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

<組織の入手>

本研究で用いた HPMC は、予め本学医学部倫理委員会にて患者組織の採取につき承認を得て、かつ informed consent を得た患者より頂いた大網組織である。

<組織の切断>

[操作]

① オートクレーブ滅菌処理した金属トレイに、滅菌済み（新品）の PBS を 1 本(500ml）入れた。

② すぐさま組織を浸し、切断箇所の上下を滅菌糸で固く縛り、縛った箇所の間を滅菌済みハサミにて切断した。

③ 同様の操作を繰り返し、数個の親指大の切片に切り分けた。

<細胞剥離>

[操作]

① 25cm^{2}培養フラスコに 10%FBS/M-199 を 5ml 加えてプレインキュベートした。

② 50ml 遠心管に、分注した 5.0%トリプトシン/2.0%EDTA 溶液 2ml と M-199 培地溶液 18ml を加え、0.5%トリプシン/2.0%EDTA 溶液/M-199 培地溶液（以下

トリプシン溶液）を作成した。

③　用意したトリプシン溶液 20ml に、親指大の大きさにした大網組織を入れて、37℃20 分間ローテーターにより攪拌しながら、インキュベートした。

④　攪拌した大網を遠心管から取り出し、次の遠心管に入れ、③の操作を行う。また、大網を取り出した遠心管は 50G（遠心半径 10cm 750rpm 原則 4℃）5 分間遠心分離を行った。

⑤　上澄みを抜き取り cell pellet を作った。50%FCS/M-199 を 2ml 加え、ボルテックスをかけて、再び 50G（遠心半径 10cm 750rpm 原則 4℃）5 分間遠心分離を行った。

⑥　再び上澄みを抜き取り、10%FBS/M-199 を 1ml 加えて 10 回のピペッティングにより細胞懸濁液を作成した。この懸濁液を①で調整した 25 ㎠培養フラスコに播種し，37 度の 5%CO_2インキュベート内にて培養した。

⑦ ③～⑥の操作を繰り返した。

A-1-3. 継代培養

<使用機器・器具・試薬>

- CO_2インキュベーター（池本理科工業/10-0212）
- ウォーターバス
- Vortex
- 25cm^{2}培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21050)
- 75 cm^{2}培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21250)
- 6 穴プレート(友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80060)
- φ35mm シャーレ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80240)
- 15ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- 50ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- 遠沈管立て
- 10ml ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ピペッター
- パスツールピペット
- チップ各種
- セルスクレーパー(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-93170)
- カウンター
- 血球計算盤
- Medium-199(SIGMA/M2154)
- PBS(SIGMA/M8537)

- TRYPSIN-EDTA SOLUTION(10x)(SIGMA/T4174)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

<細胞の洗浄>

[操作]

① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。

② 滅菌済み 10ml ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引した。

③ PBS 溶液 5ml/25cm^2 フラスコ又は 10ml/75 cm^2 フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。

④ 滅菌済み 10ml ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引した。

<継代作業>

[操作]

① 冷凍保存してあるトリプシン 1ml に培地 9ml を加え、10 倍希釈した。（以下トリプシン溶液）

② トリプシン溶液 5ml/25 cm^2 フラスコ又は 10ml/75 cm^2 フラスコを加え、37℃の CO_2 インキュベート内にて 10 分間放置した。

③ 顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、FBS 1ml/25 cm^2 フラスコ又は 2ml/75 cm^2 フラスコを加えた。

④ 滅菌済みセルスクレーパーを培養フラスコ内に挿入し、細胞を剥離した。

⑤ 滅菌済み 10ml ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠心管に入れた。

⑥ 50G（750rpm5 分間原則 4℃）遠心分離した。

⑦ 培養フラスコに 10%FBS／M-199 を入れ、37℃の 5%CO_2 インキュベート内にて放置した。

⑧ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引した。

⑨ 10%FBS／M-199 を 1ml 又は 3ml を遠心管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回ピペッティングを行った。

⑩ 細胞懸濁液を取り、⑦で用意しておいた培養フラスコに 200μl/25cm^2 フラスコ、1ml/75cm^2 フラスコ播種し、37℃の CO_2 インキュベート内にて培養した。

A-2.免疫化学染色

[原理]

標的分子を非常的に認識する抗体の性質を利用して、細胞の中のタンパク質の局在を可視化する方法。観察したい標的分子に対する抗体(一次抗体)を加え、その次に一次抗体を認識する抗体(二次抗体)を加える。そして、二次抗体に付加されている蛍光を観察することで、標的分子の局在を知ることができる。一連の反応は全て適度な塩濃度を持った緩衝液中で行い、乾燥させないのが基本である。それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する(Fig.10-3)。

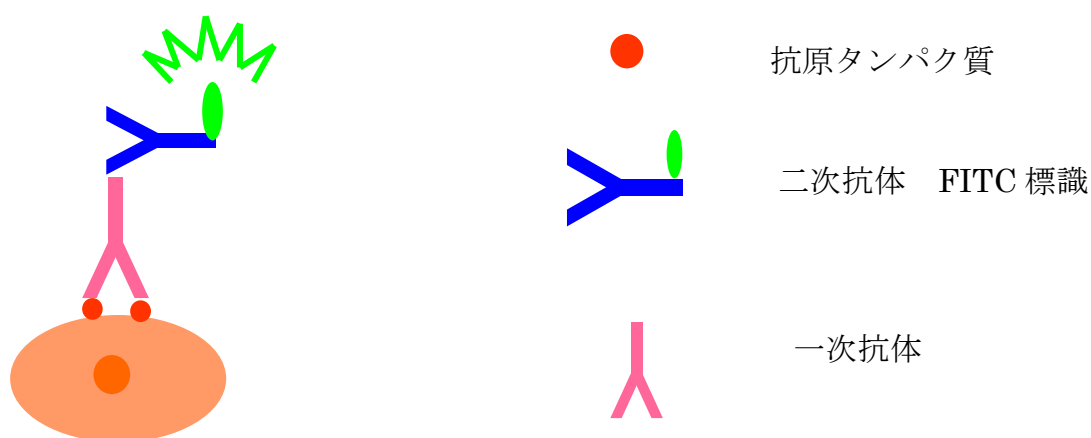



Fig.10-3　抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

・FITC（fluorescein isothiocyanate）

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が高い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

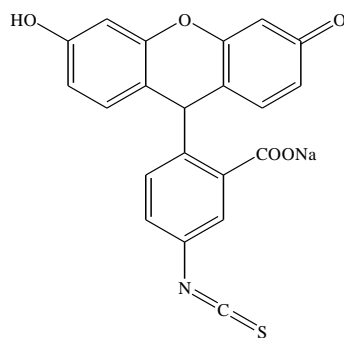



図 8-2 FITC

[試薬・器具・機器]

- 秤
- Vortex
- ピペット
- ピペッター
- マイクロピペット
- 遠沈管
- 遠沈管立て
- アルミホイル
- 共焦点顕微鏡(FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)
- アルブミン
- aceton (WAKO)
- methanol(WAKO)
- PBS(SIGMA)
- Goat anti-mouse IgG(H+L) FITC conjugate
  （Cat. No. AP308F / Millipore）
- Propidium iodide(PI) (P4170-25MG/SIGMA)
- Anti-Cytokeratin 18 Mouse-Mono(RGE53)
- （Cat.No. MUB0327S / フナコシ）
- Anti-Cytokeratin 18 phospho Ser 52, Human Rabbit
  （Cat.No. SC-17032-R /コスモバイオ）
- mouse anti-human smooth muscle actin
  （Cat.No. M085101 / DAKO）

[前準備]

① 秤でアルブミンを 4g 量り取った後、50ml 遠沈管に移し、PBS をピペットで 40ml 入れ、Vortex にて遠心した。
② 作成した 1%BSA/PBS は冷蔵庫にて保存した。

[操作]

① 細胞がいる φ35 シャーレの培地を取り除き、PBS 洗浄を行った。
② Aceton/methanol(1:1)をサンプルに加えて、r.t で 5 分間静置し固定した後、その固定液を取り除き 10 分間風乾した。
③ 1%BSA/PBS をサンプルに加えて 20 分静置した。
④ サンプルに一次抗体(希釈率；抗体：1%BSA/PBS=1：200)を 1ml 加え、4℃(冷蔵庫)、飽和湿度で overnight (10 時間以上)させた。

⑤　一次抗体を取り除き、1%BSA/PBS で 3 回洗浄した。
⑥　サンプルに二次抗体(希釈率；抗体：1%BSA/PBS=1：200)を 1ml 加えて、アルミホイルで包み、30 分間、暗所、r.t で静置した。
⑦　二次抗体を取り除き、1%BSA/PBS で 3 回洗浄した。
⑧　共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

[共焦点レーザー顕微鏡操作方法]

Ⅰ　システムの立ち上げ

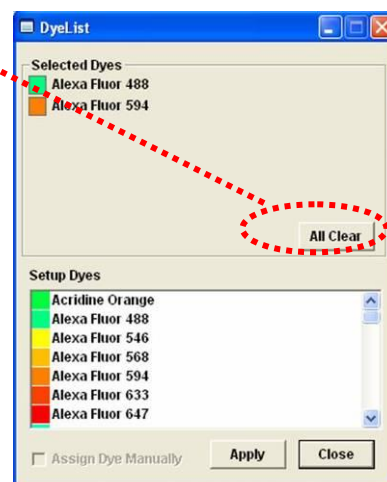
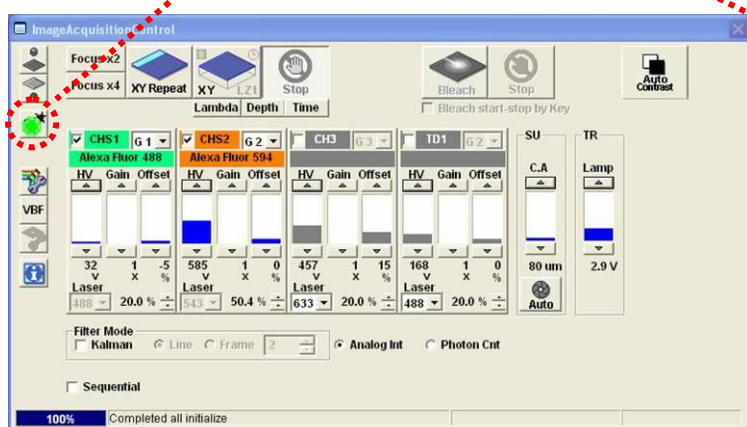
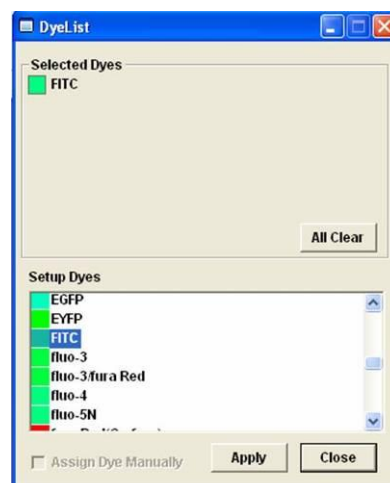
①　パソコンを ON にした。
②　レーザーを ON にした。
③　モニター上にパスワード入力画面が表示された後､水銀ランプを ON にした。
④　ユーザー名・パスワードを入力し WindowsXP へログオン。

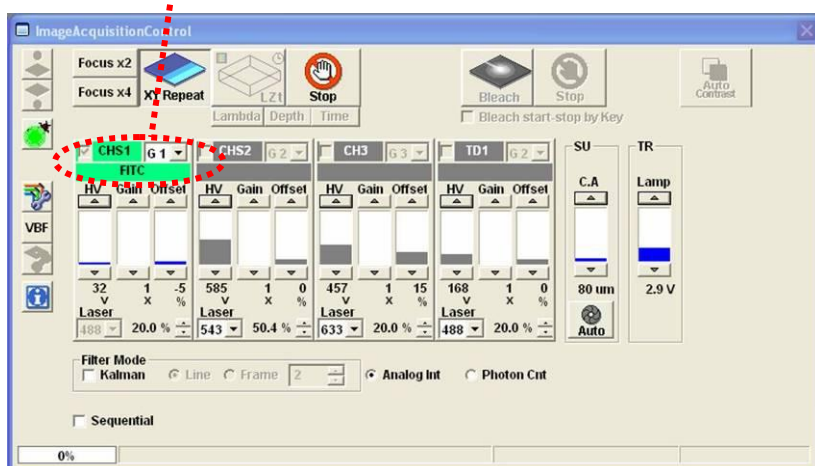
User ID：　Administrator
Password：　fluoview

⑤　FV10-ASW 1.4　をダブルクリックしユーザー名・パスワードを入力、FV10-ASW ソフトウェアを起動した。

User ID：　Administrator
Password：　Administrator

Ⅱ　蛍光試薬選択

①　DyeList ボタンをクリックし、All Clear ボタンをクリックしリセットした。

② DyeList パネルから観察する蛍光試薬を
選びダブルクリックした。

③ Apply ボタンをクリックして閉じる。

④ CHS1 の蛍光試薬が変更したことを確認した。

II 顕微鏡で目視観察

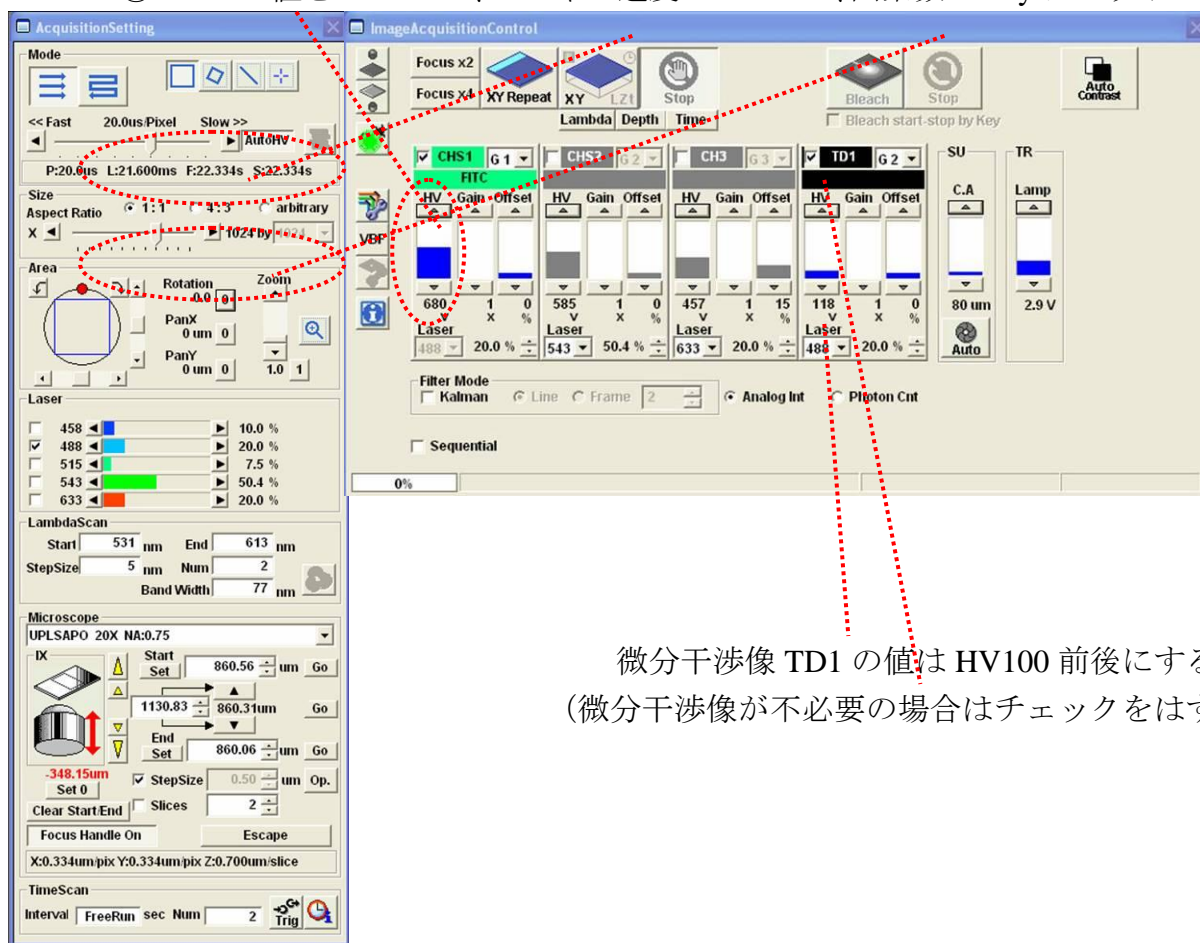
① ハンドスイッチで対物レンズを選択した。

（10,20 倍レンズ：ドライ　40,60 倍レンズ：オイルを用いた。）

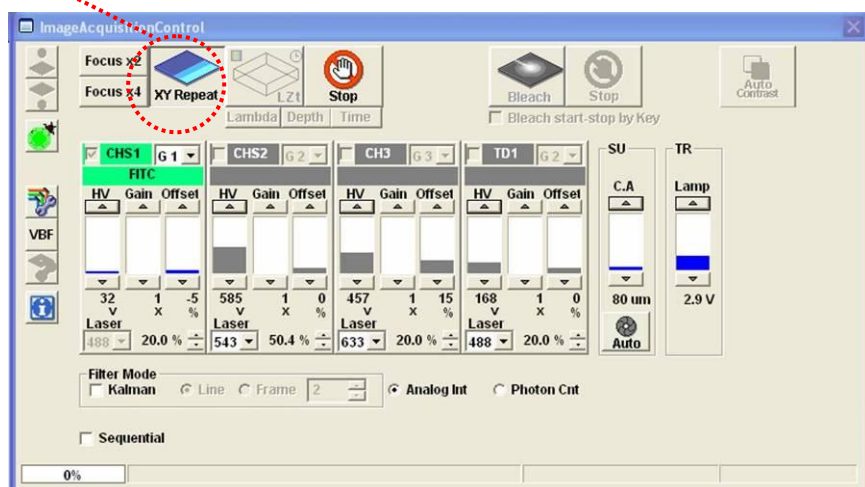
② パソコン上のアイコンをクリックし、ハロゲンランプ、蛍光レーザーの ON、OFF をした。

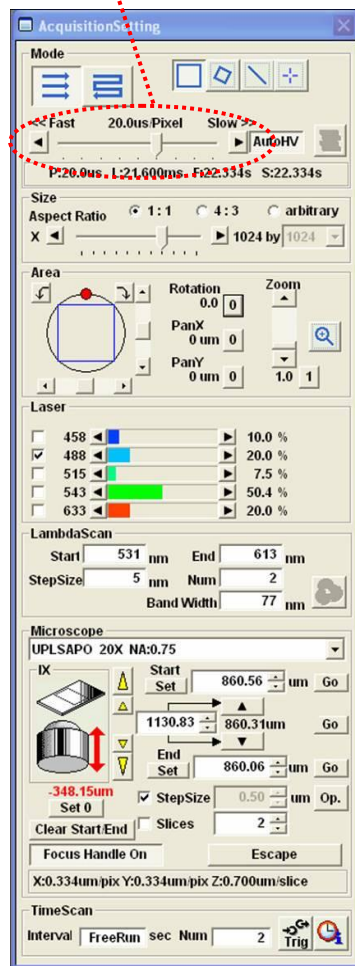
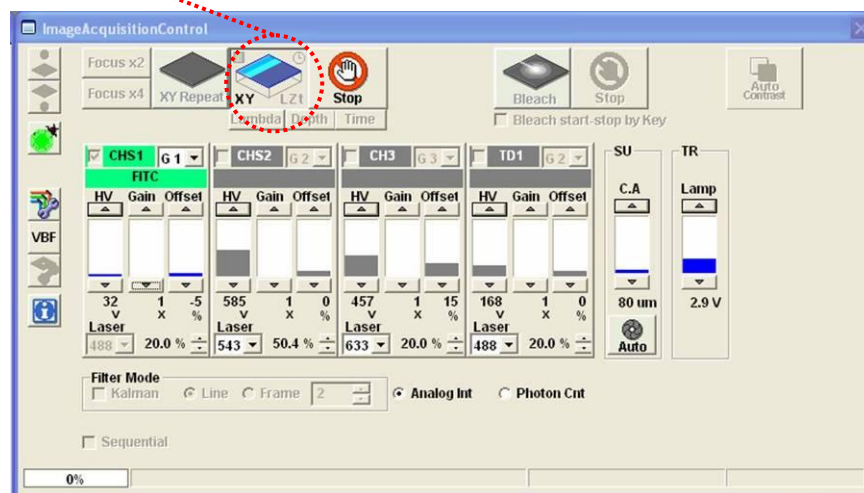
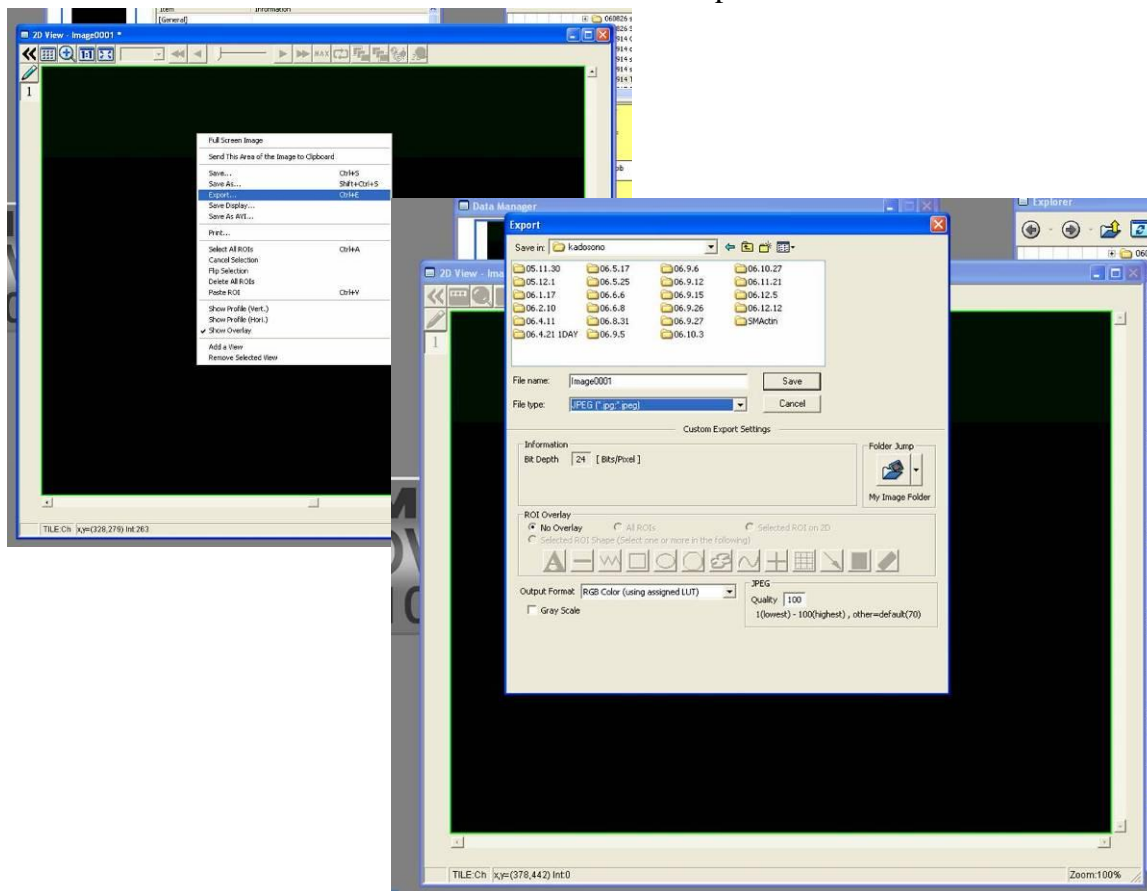
② 顕微鏡手前のフォーカススイッチ等によりピント調節した。

Ⅲ　画像の取得（試し撮り）

①　HV の値を 600～680、スキャン速度 8.0us/Pixel、画素数 512by にセットした。

微分干渉像 TD1 の値は HV100 前後にする。

（微分干渉像が不必要の場合はチェックをはずす。）

②　XY Repeat　をクリックし、画面を見ながらピントを合わせ微調整した。

IV　画像の取得（本番）

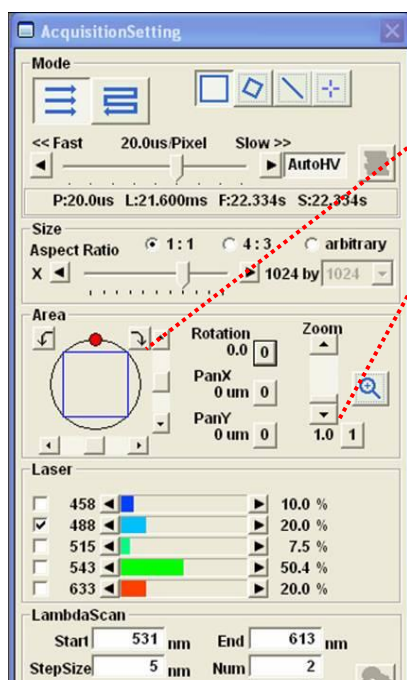
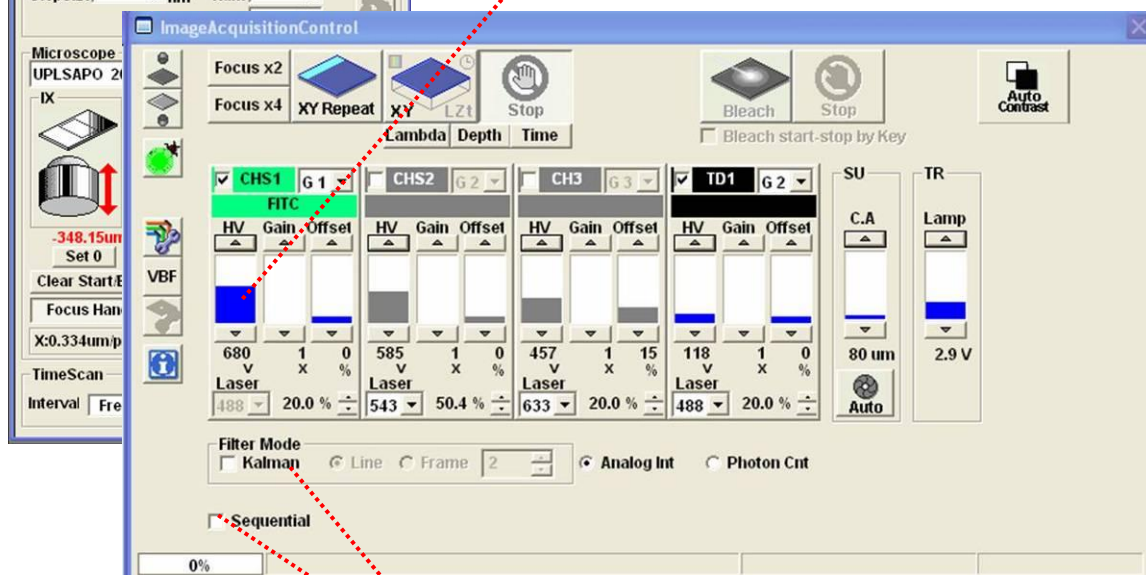
①　40.0us/Pixel に設定を変更した。

②　（XY ボタン）をクリックし、画像を取得した。

③　取得した画像の上で、右クリックし Export を選択、名前をつけて保存した。

V　システムの終了

①　FV10-ASW ソフトウェアを終了した。

②　WindowsXP を終了した（Start/ShutDown→「ShutDown」を選択）。

③　レーザーを OFF にした。

④　水銀ランプを OFF にした。

補足

単染色ではチェックを入れない。

A-3. 膜間電気抵抗(TER)測定

[原理]

TER 測定は 2 本の電極対で構成されている STX-2 電極(表 10-2)と EVOM ボルトオームメーターを用いて測定する。外側の電極は試料膜を介して電流を流すための微小な銀電極であり、内側の電極は電圧を測定するための銀／塩化銀電極である。電圧検知用±20μA の交流矩形波電流を 12.5HZ の低周波で印加する。電圧を測定することで、オームの法則 $R = E/I$ より抵抗値を算出する。細胞間のイオンの透過に対しての抵抗を測定できることから、簡易的な細胞間の結合状態の評価を行うことができる。この装置の使い方として細胞播種時から経日的に測定を行うと細胞間結合の形成度合いが測定できる。また細胞がコンフレントになってから細胞間結合に影響を与える可能性がある検査試薬を加えることで、細胞間結合の増減度合いが測定できる。

表 10-3　EVOM／STX-2 電極の概要

膜電圧範囲	±199.9mV
抵抗範囲	0~1999Ω，0~20kΩ の 2 レンジ
交流矩形波電流	±20μA，12.5Hz
電極	銀／塩化銀電極（電圧測定用） 銀電極（電流通電用）

[試薬・器具・機器]

・上皮膜用ボルト･オームメータ（EVOM）　(World Precision Instruments)
・EVOM 用 STX-2 電極　(World Precision Instruments)

[操作準備・装置説明]

Ⅰ　STX-2 電極の消毒(図 10-1)

① STX-2 電極を 70%エタノールに 10 分間浸漬した。
② STX-2 電極を取り出し、10 分間風乾させた。

Ⅱ　膜間電気抵抗測定(図 10-2)

① STX-2 電極を EVOM につないで、電源を入れた。
② Range → 2000Ω レンジ, Mode → R, Power → On, Measure → R にあわせた
③ STX-2 電極を Transwell に挿入し、Measure ボタンを押して各 well の TER を測定した。
④ well に対する電極の位置を確認し、毎回一定の位置で測定を行った。

⑤ 3 箇所で測定を行い、平均値を算出した。

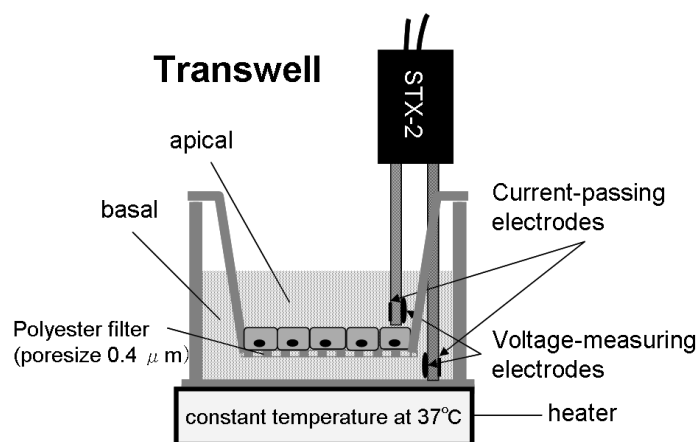



図 10-1　TER 測定装置

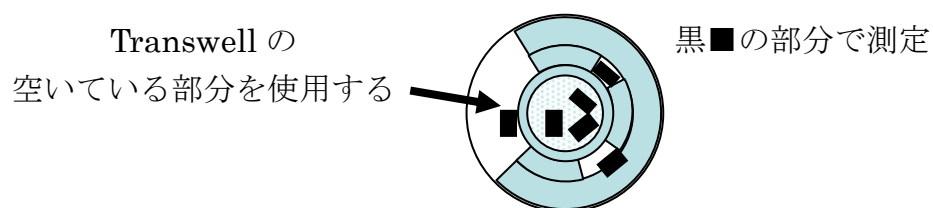



図 10-2　Transwell 測定場所

A-4. Western Blotting 法

◎目的

目的のタンパク質を電気泳動による分離と抗原抗体反応の組み合わせで高感度に検出し、定量する方法

◎操作の流れ

1. 細胞からタンパク質の抽出

↓

2. タンパク質の定量(BCA 法)

↓

3. SDS-PAGE　　＊電気泳動で分子量ごとに分離させる

↓

4. ウェスタンブロッティング　　＊ゲル中のタンパクを膜に転写させる

↓

5. 一次抗体　　＊目的のタンパク質を特異的に認識させる
↓
6. 二次抗体
↓
7. バンドの定量

◎測定の原理

・BCA 法

蛋白はアルカリ溶液中で 2 価の銅イオンに作用し、1 価の銅を生成させます。この１価の銅イオンが２分子の BCA（Bicinchoninic Acid)分子と錯体を形成し紫紅色を発します。その際の吸光度を測定することでタンパク質濃度を求める

・SDS－PAGE

SDS は水溶性タンパク質 1g 当たり約 1.4g 結合して SDS-タンパク質複合体を形成します。タンパク質分子自身が持つ電荷は SDS との結合によってほとんど打ち消されている。また、還元剤である 2－メルカプトエタノールによってタンパク質の S-S 結合（ジスルフィド結合）が切断され、SDS が結合したタンパク質の形状はほぼ直鎖状になっているため、タンパク質分子の本来の形状は移動速度に影響を及ぼさない。これらのことから、ゲル内でのタンパク質の移動のしやすさは分子の大きさとそれに比例した負電荷の量にのみ左右され、分子量に従って分離することができる。

A-10-1. 細胞からのタンパク抽出

〔使用器具・試薬〕

・タンパク抽出液、PBS(冷やした物)、phosphatase inhibitor、proteinase inhibitor、セルスクレーパー、遠心分離機

〔操作〕

① 培地を吸引し、冷やした PBS で洗浄する。
② タンパク抽出液を 300μl 加えて、そこに phosphatase inhibitor、proteinase inhibitor をそれぞれ 1μl 加えて、10 分間振盪する。
③ セルスクレーパーで細胞をしっかりと剥がし、1.5ml のアシストチューブに溶液を移す。
④ 4℃の遠心分離機で 15000rpm、30min 遠心分離する。
⑤ 上澄み溶液だけをできる限り取り出し,500ml のアシストチューブに移し替える。
⑥ -80℃の冷凍庫に保存する。(保存前に BCA 法を行っても良い)

※保存の際には、用いた細胞、実験条件、実験日などをシールに記載し、はっておくと良い

A-10-2. タンパク質の定量(BCA 法)

〔使用器具・試薬〕

・Spectrophotometer (SmartSpec^{TM}Plus, BIO-RAD)

・ビシンコニン酸、酒石酸ナトリウム、Na_2CO_3、NaOH、$NaHCO_3$、硫酸銅(Ⅱ)5 水和物

〔操作〕

①A 溶液、B 溶液をそれぞれ作製する。

・**<u>A 溶液 (数ヶ月室温保存)</u>**

ビシンコニン酸	1g	100ml にメスアップ後 NaOH を加え、pH11.25 にする。
酒石酸ナトリウム	0.16g	
Na_2CO_3	2g	
NaOH	0.4g	
$NaHCO_3$	0.95g	
DW	適量	

・**<u>B 溶液 (室温保存)</u>**

$CuSO_4$・$5H_2O$	4g
DW	100ml

② スタンダード(1mg/mA　BSA)を作製し、下表のように加える。

1mg/ml BSA (μ l)	DW (μ l)	試験管1本当たりのBSA量 (μ l)
0	10	0
2	8	2
4	6	4
6	4	6
8	2	8
10	0	10

③A 溶液と B 溶液を 50：1 で混合する。

④ サンプルとスタンダードをそれぞれ 10μl ずつアシストチューブにとり(各サンプ

ル 2 本ずつ)、(３)で作製した溶液を 100µ ずつ加える。

⑤ ボルテックスで攪拌する。

⑥ 37℃、30 分で静置する。

⑦ OD_{562} を測定する。

⑧ タンパク質濃度を横軸、吸光度を縦軸にとり、検量線を作り、総タンパク質量を測定する。

＊Spectrophotometer (SmartSpec™Plus, BIO-RAD) 操作方法

1. 電源を入れる
2. λ を押す
3. enter を押す (波長の読み取り　１)
4. 波長を 562nm に設定する
5. enter を押す (バックグラウンド読み取りをひきますか No)
6. select → enter を押す (繰り返して読むサンプルはありますか YES)
7. enter を押す (試料の反復番号 3)
8.セルに Blank(A 液+B 液)を 100µl 入れ、Read Blank を押す
9. →を押す
10. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く
11. セルに試料を入れ、Read Sample を３回押す
12. 試料を戻して、セルを脱イオン水で洗浄し、脱イオン水を取り除く
13. 10～11 を繰り返す

A-10-3. SDS－PAGE による蛋白質の分離

〔使用器具・試薬〕

・ゲル板(前面ガラス板、ミミ付ガラス板)、シリコンガスケット、プラスチック製クリップ、コーム、電気泳動槽(AE-6410 型,ATTO)、電源装置(クロスパワー500,ATTO)

・Tris(トリスヒドリキシメチルアミノメタン)、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、HCl、アクリルアミド(Wako)、Bis (N.N'-メチレンビスアクリルアミド)(Wako)、APS(過硫酸アンモニウム)、グリシン、BPB(ブロムフェノールブルー)、2－メルカプトエタノール、グリセロール、TEMED(N,N,N',N'－テトラメチルエチレンジアミン)、分子量マーカー(HMW SDS Marker Kit,Amersham)、MagicMark XP ウェスタンプロテインスタンダード(Invitrogen)

〔操作〕

1) 電気泳動用試薬の調製

・**1.5M Tris-HCl (pH8.8),0.4%SDS**

Tris54.5g、SDS1.2g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 17ml)を加えて pH8.8 に合わせ、脱イオン水で 300ml にメスアップする。

・**0.5M Tris-HCl (pH6.8),0.4%SDS**

Tris6.0g、SDS0.4g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 9ml)を加えて pH6.8 に合わせ、脱イオン水で 100ml にメスアップする。

・**30%アクリルアミド溶液**

アクリルアミド 58g、Bis2.0g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 200ml にメスアップする。

・**0.4% SDS**

SDS0.2g に脱イオン水 50ml を加えて溶解する。

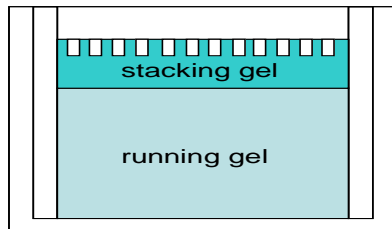
・**10%APS**

APS 0.1g に脱イオン水 1ml を加えて溶解する。

・**泳動バッファー**

Tris3.0g、グリシン 14.4g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 1000ml にメスアップする。その後、SDS1.0g を加え、溶解させる。

・**サンプルバッファー**

0.5M Tris-HCl (pH6.8) 2ml、0.4% SDS 4ml、2ーメルカプトエタノール 1.2ml、グリセロール 2ml、脱イオン水 0.8ml、0.1%BPB 数滴を混ぜる。

2) ゲル板の組み立て

① 前面ガラス板とミミ付ガラス板、シリコンガスケットをエタノールで拭く。

前面ガラス板　　　　ミミ付ガラス板　　　　シリコンガスケット

コーム　　　　　　　　　　　　　　クリップ

② ミミ付ガラス板にシリコンガスケットをセットし、前面ガラス板をのせて、クリップでとめる。

③ コーム(comb)を差し込み、コームの下底から 5mm のところに目印を入れる。

3) running gel、stacking gel の作製

REAGENT	アクリルアミド濃度（%）				
	Runnning gel				Stacking gel
	5%	7.5%	10%	12.5%	4.5%
分画分子量範囲	30~200kDa	40~200kDa	20~130kDa	14~80kDa	—
30% **アクリルアミド溶液**	2.0ml	3.0ml	4.0ml	5.0ml	0.9ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8), 0.4%SDS	3.0ml	3.0ml	3.0ml	3.0ml	—
0.5M Tris-HCl(pH6.8), 0.4%SDS	—	—	—	—	1.5ml
APS	120μ l	120μ l	120μ l	120μ l	60μ l
TEMED	12μ l	12μ l	12μ l	12μ l	6μ l
脱イオン水	7.0ml	6.0ml	5.0ml	4.0ml	3.6ml
Total Volume	12.0ml	12.0ml	12.0ml	12.0ml	6.0ml

＊ 目的とするタンパク質の分子量に対応して、ゲル濃度を決定する。
＊ 表はゲル 1 枚分の量を示している。

＊ アクリルアミドのモノマーは神経毒であるので、試薬を扱う時は手袋、マスクを着用する。

① running gel 溶液、stacking gel 溶液を上の表に従って作成する。(但し、TEMED はこの時点では加えない)
② running gel 溶液をアスピレーターで脱気する。(1～2 時間程度)
③ 脱気後、TEMED 12μl を加え、軽く混ぜる。
＊ 微量なのでピペット操作は要注意。
④ 素早く、2)で準備したゲル板の目印のところまで running gel 溶液を入れる。
＊ フラスコから直接注ぎ込む。
⑤ ピペットで脱イオン水をゲル液面上に重層する。
⑥ ゲル化するまで静置する。(1 時間程度)
＊ アクリルアミドは 20℃以下では重合しにくいため、室温に注意。(特に冬期は注意)
＊ ゲルと水の界面ができていればゲル化しているので、水を捨ててキムワイプで軽く拭く。
⑦ ゲル化させている間に stacking gel 溶液をアスピレーターで脱気する。
⑧ 脱気後、TEMED 6μl を加え、軽く混ぜる。
＊ 微量なのでピペット操作は要注意。
⑨ 素早く、ミミ付ガラス板の切り欠きの少し下まで stacking gel 溶液を入れる。
⑩ コームを気泡が入らないように差し込み、1 時間静置してゲル化させる。
＊ コームを両手で持ち、水平に差し込む。

4) 各ウェルにローディングする試料溶液の調製
① 各ウェルに加えるタンパク量に相当する試料の体積を BCA 法により測定した濃度から算出する。
② ①で算出してタンパク量とサンプルバッファーを 1:1 で混合する。
③ ボルテックスで攪拌する。
④ 100℃の熱湯で 3 分間ボイルする。
⑤ ボルテックスで攪拌する。

5) 電気泳動
① 電気泳動槽に底から(陽極側)泳動バッファーを入れる。
② ゲル化したらコームをそっと抜き取る。
③ クリップとシリコンガスケットを外し、ゲル板を締め付け具に固定し、電気泳動槽に入れる。

④ ゲルの上部(陰極側)が十分に浸るぐらい電解槽液を入れる。
⑤　シリンジを用いて、ウェルを電解槽液で洗浄する。
⑥ サンプルをピペットでウェル内にゆっくり注入する。
＊ ガラスにマジックでサンプル番号を書くと見やすい。
＊ 分子量マーカーはサンプルバッファーを加えずに、分子量マーカー5μl 注入。
Magic marker は、最終的に発現物質の分子量を確認しなければならない時に 3μl 流す。
⑦ 電極端末を接続し電源を入れ、ゲル 1 枚のときは 15mA の定電流で、ゲル 2 枚のときは 30mA の定電流で泳動する。
＊ BPB 線がゲル下端から 5mm の位置にくるまで泳動する。

A-10-4. ゲル(膜)の染色 (CBB 染色)

〔使用試薬〕

メタノール、酢酸、CBB-R250(クマシーブリリアントブルー)

〔操作〕

1) 試薬の調製

・染色液 → 室温で保存&再使用

CBB-R250 2.5g、メタノール 500ml、酢酸 50ml、脱イオン水 450ml

・脱色液 → 室温で保存

メタノール 50ml、酢酸 70ml、脱イオン水 880ml

2) 操作

1. 電気泳動の終わったゲルを染色液に入れる。
2. 室温で 15 分間振盪する。
3. 膜を染色する場合は、数十秒振盪する程度でよい。
4. 染色液をビンに戻し、脱色液を少量入れる。
5. 容器を軽く揺すり、染色液をすすぎ、脱色液を捨てる。
6. 脱色液をたっぷり入れて、キムワイプを 2,3 枚脱色液に浸けこむ。
7. 脱色の際にキムワイプを適宜交換することで、脱色を早くすることが出来る。
8. 室温で数時間〜一晩振盪する。
9. 膜の場合は乾燥させることでバンドが確認できるため､冷風などで膜を乾燥させる。

A-10-5. ゲルから膜への転写(Western blotting)

〔使用器具・試薬〕

・PVDF 膜(ポリフッ化ビニリデンメンブレン)、ブロッティング濾紙、ブロッティング装置

・Tris(トリスヒドリキシメチルアミノメタン)、メタノール、6-アミノカプロン酸

〔操作〕

1) 試薬の調製

・**A 溶液(0.3%M Tris　5%メタノール溶液)**

Tris 3.6342g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

・**B 溶液　　(トランスファーバッファー)**

まず、10x トランスファーバッファー(Tris:15.15g グリシン:72.05g SDS:0.5g を 500ml の脱イオン水に溶かす)を作成する。

その後、10x トランスファーバッファー:50ml + メタノール:100ml + 脱イオン水:350ml を混ぜる。

・**C 溶液(25mM Tris　40mM 6-アミノカプロン酸　5%メタノール溶液)**

Tris 0.3029g、40mM 6-アミノカプロン酸 0.5247g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

2) Western blotting

① 電気泳動終了前に、PVDF 膜を running gel と同じ大きさに切り、メタノールに 30 秒ほど浸し、次に B 溶液に浸し 30 分ほど振盪させる。

② さらに、電気泳動終了前に、ブロッティング濾紙 6 枚を running gel と同じ大きさに切り、A 溶液に 2 枚、B 溶液に 1 枚、C 溶液に 3 枚浸す。

③ 電気泳動終了後、ガラス板の隙間にスパチュラを差し込み、この原理でガラス板をはがす

④ stacking gel を取り除き、running gel 部分のみにして、脱イオン水で軽く洗浄した後、B 溶液に 10 分間浸す。

⑤ 準備してあったブロッティング濾紙で、まず A 溶液に浸した濾紙 2 枚をブロッティング装置にのせる。さらに、B 溶液に浸した濾紙 1 枚、PVDF 膜、ゲル、C 溶液に浸した濾紙 3 枚の順に上へ重ねる。

⑥ グローブをはめ、手のひらで全体を押しつぶすように気泡を抜き、膜とゲルを密着させる。

⑦ 一番上の濾紙に C 溶液をかけ、陰極板をセットし、リード線をつなぐ。

⑧ ゲルの面積 1cm^2 あたり 2mA の定電流で約 40 分間ブロッティングする。

⑨ 膜を脱イオン水で軽く洗浄し、乾燥させる(overnight)。

A-10-6. 抗体処理

〔使用試薬〕

・PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal(東洋紡)、PBS、TritonX-100、PBS 粉末、Immunoreaction Enhancer Solution1(東洋紡)

一次抗体

α-SMA の場合：Rabbit polyclonal to alpha smooth muscle actin
（Cat.No. ab15734 / abcam）

Cytokeratin-18 の場合：Anti-Cytokeratin 18 phospho Ser 52, Human Rabbit
（Cat.No. SC-17032-R / コスモバイオ）

二次抗体

HRP-Goat anti-Rabbit IgG(H+L)　（Cat.No. #7074 / CST ジャパン）

6-(1). 一次抗体

〔操作〕

1) 試薬の調製

・PBS

PBS 粉末を脱イオン水に溶解して全量を 1000ml にする。

・0.1%PBST

PBS 1ℓ に Triton1.0ml を加える。

・一次抗体

Immunoreaction Enhancer Solution1(東洋紡)1ml に一次抗体 1μl を加え 1000 倍希釈する。(α-SMA の場合は、Solution1 を 1ml に対して一次抗体 2μl を加える。)

2) 操作

① PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal をサランラップに 3ml 置き(膜の大きさで量を調節)、タンパク面を溶液に浸してサランラップを包み、常温で 20 分ブロッキングする。

② PBST で 5 分洗浄を 3 回繰り返す。(室温)

③ サランラップにパラフィルムを乗せ、その上に一次抗体溶液を乗せ、タンパク面を溶液に浸してサランラップを包み、4℃で overnight。

※一次抗体を良く結合させたい場合は overnight。時間を短縮したい場合は、常温で 1 時間静置して、次の作業を開始する。(overnight を推奨)

6-(2). 二次抗体

〔操作〕

1) 試薬の調製

・二次抗体

Immunoreaction Enhancer Solution2(東洋紡)2ml に HRP 標識二次抗体(HRP-Goat anti-Rabbit IgG(H+L))を 1μl 加え、2000 倍希釈する。

・ECL

1 液と 2 液を必要量とる。測定直前に混ぜる。

＊アルミで遮光、氷上

＊1 液と 2 液は等量混ぜ、0.125ml/cm^2 を目安に ECL の量を決める。

2) 操作

① PBST で 5 分毎に 3 回洗浄。(バックグラウンドに影響するため、しっかりと洗浄すること)

② サランラップにパラフィルムをセットし、その上に二次抗体溶液を乗せてタンパク面を重ねるようにして PVDF 膜をのせ、室温下で 15 分静置させる。

＊ 抗体溶液が移動しないように水平にセットする。

③ ①の操作を行う。

A-10-7. バンドの定量

〔使用器具・試薬〕

・ルミノイメージアナライザー(LAS-4000 mini EPUV,FUJIFILM)

・ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

〔操作〕

① 洗浄した膜をラップ上にのせる。

② ECL の 1 液、2 液を混ぜ、膜上に添加する。

＊ 3 分間静置させる。

③ 新しいラップ上に膜を移し、ラップで包み込む。

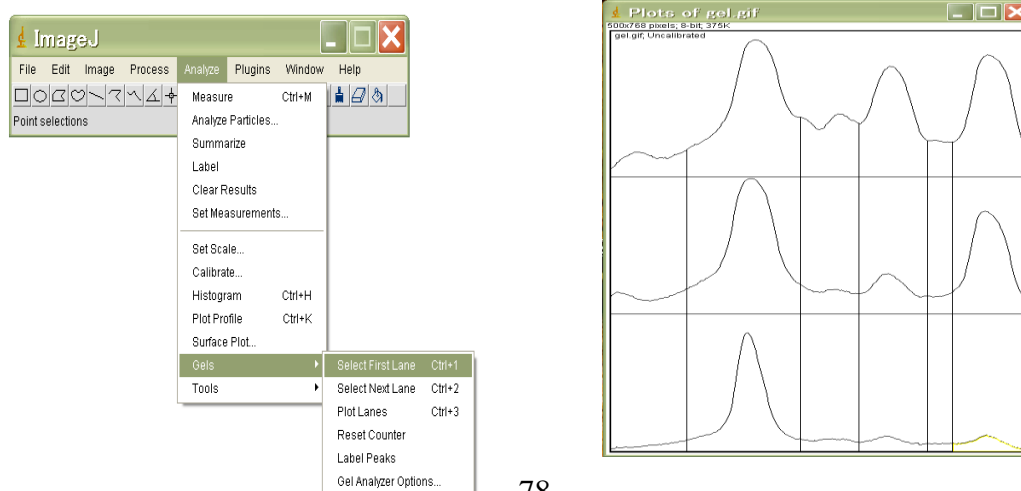
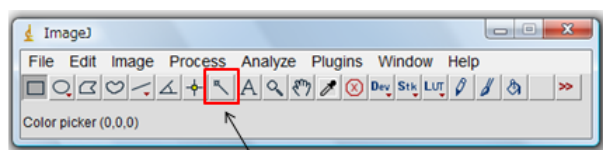
＊しわがつかないように包む

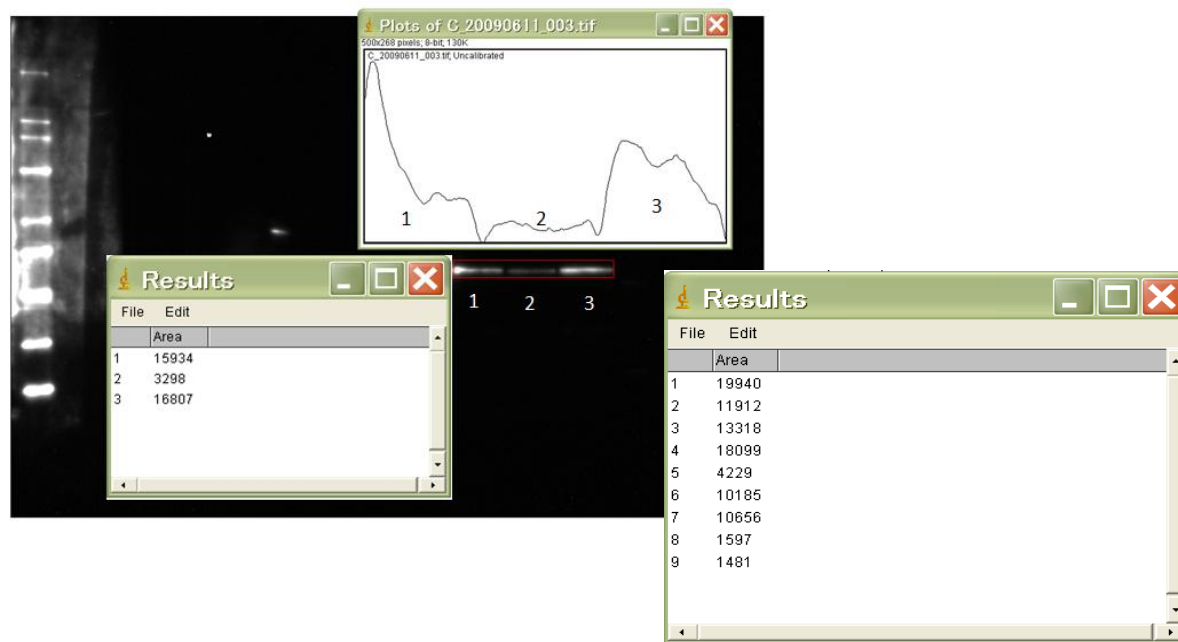
④光にさらさないように箱に入れて、ルミノイメージアナライザーの場所へ行く。

[ルミノイメージアナライザーの操作方法]

※予約表と使用表に名前などを記載すること（ルミノイメージアナライザーの横のファイルに紙が入っている）

① 装置の電源と、コンピュータの電源を付ける。
② ルミノイメージアナライザーのアイコンを選択し、装置が-25℃に設定されるまで待機。
③ 膜をセットする。
※分子量マーカーが真っ直ぐ縦になるように膜をセットすると定量化の際便利
④ Method/Tray position を選択し、Chemiluminescence、EPI にチェックが入っていることを確認する。
⑤ Tray position を、選択したポジションの番号にチェックを入れ、OK を押す。
⑥ Focusing を選択し、明るさや焦点を合わせる。
⑦ Exposure Type を Precision あるいは Increment を選択。
Precision：光を指定時間照射し、1 枚だけ写真を撮影する
Increment：指定時間毎に写真を撮影し、画像を積み重ねていく
⑧ 時間を指定し、Start を押す。
⑨ 画像を保存する際、1 枚目から最後の画像までを保存するように指定し、Next を押し、保存先を指定した後に 8bit Tiff file に保存方法を変更して保存する。
⑩ USB に画像を入れて持ち帰る。

＊ Image　J による定量方法
<使用方法>
① 四角くレーンを選択する(できるだけ小さく囲う)
② Analyze ⇒ Gels ⇒ Select First Lane を選択
③ Analyze ⇒ Gels　⇒ Select Second Lane を選択し、次のレーンを選択
④ 測定したいレーンを②を繰り返す
⑤ Analyze ⇒ Plot Lane を選択
⑥ グラフ化されて表示される
⑦ 調べたい部分の面積をクリックすることで面積が表示される
⑧ コントロールを 1 として比でグラフ化を行う

このボタンを押して、知りたい面積部分をクリック

結果例

A-4. 細胞面積算出

細胞面積算出には解析ソフト“Image　J”を用いた。以下の手順で測定した。

[操作]

① 位相差顕微鏡写真をほぼ毎日撮影し、confluent になるまで撮影した。

② Image　J を開き、confluent の写真をドラッグして開き、「Analyze」→「Set　Scale」を選択し、「Distance in Pixels:750」「Known Distance:400」「Unit of Length:µm」に設定し、OK を押した。

③ 「Analyze」→「Set　Measurements」で「Area」を選択し、OK を押した。

④ 「polygon selections」を選択し、細胞の周囲を囲んだ。

⑤ 囲み終わったら、半角の m を押すことで面積が測定できた。

④、⑤を繰り返し行った。

A-6. SA-β-Gal 染色

[原理]

Senescent Cells Histochemical Staining Kit は老化細胞を同定する素早い染色方法に使用される全ての試薬が含まれる。β-galactosidase 活性の組織化学染色は pH6 に基づいている。これらの条件において β-galactosidase 活性は老化細胞で容易に検出できるが静止状態、不死化、腫瘍細胞においては検出されない。

[試薬]

・Senescent Cells Histochemical Staining Kit　（Cat.No. CS0030 / Sigma-Aldrich）

Components

・Fixation Buffer 10x (Cat No. F1797)　15 ml
Solution containing 20% formaldehyde,
2% glutaraldehyde, 70 mM Na_2HPO_4,
14.7 mM KH_2PO_4, 1.37 M NaCl, and 26.8 mM KCl

・Reagent B (Cat No. R5272)　1.5 ml
400 mM Potassium Ferricyanide

・Reagent C (Cat No. R5147)　1.5 ml
400 mM Potassium Ferrocyanide

・X-gal Solution (Cat No. X3753)　4 ml
40 mg/ml

・Staining Solution 10x (Cat No. S5818)　15 ml

・Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x (Cat No P3621)　60 ml

Preparation Instructions

※この手順における試薬の分量は 35mm plates で 6tests 用である。異なる plates/wells では Appendix 1 に従って量を計算する。

※使用前にキットの全てを解凍し、溶液が均質に溶けるまでよく混ぜる。

※キットの溶液の調整には滅菌水を使用する。
※X-gal Solution – 1 時間、37℃で X-gal Solution を温める。染色された細胞を観察するための妨げとなる凝集形成を防ぐために非常に大切である。

※1x Fixation Buffer – Fixation Buffer 10x を 10 倍の滅菌水で希釈する。1x Fixation Buffer の調整後、-20℃で保存する。35mm plate では 6tests 用に 10ml 調整する。

※1-PBS – PBS 10x を 10 倍の滅菌水で希釈する。調整後、1x PBS は 2-8℃で保存する。3 mm plate では 6tests 用に 35ml 調整する。

※Staining Mixture – (Prepare just prior to use)
10ml Staining Solution の調整に以下の試薬を用いる。
・1ml Staining Solution 10x
・125μl Reagent B
・125μl Reagent C
・0.25ml X-gal Solution
・8.50ml 滅菌水
溶液中に凝集が残らないように Staining Solution を 0.2μm filter を用いて濾過する。

Procedure

1. 細胞から培地を吸引する。
2. 1ml 1x PBS で 2 回洗浄する(per well/plate)。細胞がはがれないように丁寧に洗浄溶液を吸引する。
3. 1.5 ml/well 1x Fixation Buffer を加え室温で 6-7 分インキュベートする。
4. 固定している間に Staining Mixture を調整する。
5. 1ml 1x PBS で 3 回洗浄する(per well/plate)。
6. 1ml/well Staining Mixture を加える。
7. 細胞が青色に染色されるまで 37℃でインキュベートする(w/o CO_2, 2hours to overnight)。
8. 乾かないように plate を Parafilm で密閉する。
※老化細胞の染色は pH に依存している。したがって、細胞は染色している間は CO_2 が豊富な状態でインキュベートしてはいけない。

9. 顕微鏡で細胞を観察する。染色された細胞数と総細胞数をカウントする。
β-galactosidase 発現細胞の割合を求める。
10. 染色後、Staining Solution を除き 1x PBS と入れ替えてもよい。

Appendix 1

Relative Volumes for Scale Up/Down of Staining Procedure

Plate	Well diameter (mm)	Growth area (cm2)	Volumes relative to 35 mm plate
100 mm	100.00	78.50	8.26x
60 mm	60.00	30.00	3.15x
35 mm	35.00	9.50	1x
6 well	34.80	9.50	1x
12 well	22.10	3.80	0.4x
24 well	15.60	1.90	0.2x
96 well	6.40	0.32	0.034x

B-1. 滅菌について

<高圧蒸気滅菌>
高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)は、滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶、ケースなどに入れ、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて行う。滅菌後は 50 度のオーブンに入れ、乾燥・保管する。
液体の高圧蒸気滅菌は専用の耐圧ビンに入れて行う。但し、液体は全体が均一な温度(121℃)になるまで時間が掛かるため、通常の器具滅菌の場合よりも 1L あたり 20 分程余分に行う。

<乾熱滅菌>
乾熱滅菌も滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶に入れて行う。ピペットの場合は吸入口に専用の綿を詰め、滅菌缶に入れて滅菌する。その他のガラス器具などは口にアルミホイルで蓋をし、そのまま滅菌する。乾熱滅菌の温度と時間は以下の通り(Table.B-2-1)。

一般的な滅菌	RNase free にするための滅菌
160~170℃/2~4h もしくは 180~200℃/0.5~1h	180℃/8h 以上(Over Night) もしくは 250℃/0.5h 以上

Table.B-2-1 乾熱滅菌

※ 乾熱滅菌は冷めるまでが滅菌なので、必ず冷めるまでまつこと。

※ 高圧蒸気滅菌と乾熱滅菌のいずれの場合も、必ず滅菌対象の材質・耐熱温度を確認すること。機器の損傷の恐れもある。

<ガス滅菌>

高温耐性のない器具を滅菌する際に使用する。滅菌対象物とガスのバイアル瓶を専用の袋に入れて、密封後のガスのバイアル瓶を折り、ガスを充満させる。このガスは人体にも有害であるため、作業は必ずドラフト内で行い、開始後 2 週間程度ドラフト内に放置する。

<UV 殺菌>

クリーンベンチは使用後に必ず UV 滅菌灯を点灯し、ベンチ内を殺菌した。その際、ベンチ内のプラスチック製品は全てアルミホイルで巻くこと。

<主要器具の滅菌方法>

○クリーンベンチ内器具一式

- ピンセット×1
- 50ml、100ml ビーカー×各 1
- シャーレ×2

① ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。

② 滅菌缶に器具を詰め､滅菌テープで封印し 121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

○手術器具一式

- ピンセット(拘つき）×1、(拘無し)×3~4
- ハサミ(直、先丸)×各 1
- 鉗子×1
- 滅菌糸(20cm 程度のもの)×20

専用の金属トレイに器具を詰め、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

○チップ、Reaction Tube with Cap(PCR 専用チューブ)
専用のケース、金属缶に詰め、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。詰める作業は必ず手袋を着用して行った。

○10ml ピペット、パスツールピペット
①20 倍希釈の無リン洗剤に約 24 時間浸漬後、約 24 時間水洗いした(浸漬液は 2 ヶ月毎に交換した)。
②水気を取り、10ml ピペットは吸入口に綿栓をし、滅菌缶につめた。パスツールピペットは綿栓をせずに 3 本毎にアルミホイルで巻いて滅菌缶につめた。
③180℃で 4 時間乾熱滅菌した。

○ゲル作製用三角フラスコ、メスシリンダー
①ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。
②乾燥後、口に 7cm 四方程度のアルミホイルで蓋をした。
③そのまま 180 度/Over Night にて乾熱滅菌を行った。

B-4. 本研究で使用した試薬について

<FBS の不活化・分注・保存>
① -20℃にて凍結保存されている FBS(500ml)を 37℃のウォーターバスに浸け、振り混ぜながら溶かした。
② 完全に溶かし終えたら、数回振り混ぜた。
③ 55~56℃のウォーターバスで 30 分加熱した。
④ STERICUP™ にてフィルター滅菌し、30ml アシストチューブに 20~25ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。
⑤ -20℃の冷凍庫にて保存した。
※分注後初めて解凍、使用する場合は、必ず Vortex にかけること。

<ITS>
ITS(粉末状)の瓶に DEPC 処理水 50ml を入れ、攪拌、溶解させたものを分注した。

<HC>
HC の粉末 2mg を量り取り、無水 EtOH と DEPC 処理水をそれぞれ 1ml ずつ加えて溶解させたものを MILLEX®GP にて濾過、分注した。

<DEPC 処理水の作製>

① Milli-Q 水を密閉できるガラス瓶(青蓋の 500ml メディウムビン)に入れた。
② 500ml の Milli-Q 水に対し DEPC を 500μl(0.1%)加えて、蓋をきっちり閉めてよく振り混ぜた。
※DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。
③ そのまま 37℃のオーブン内に入れ、2 時間加温した。30 分に一度振り混ぜた。
※ 振り混ぜることで瓶の蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。
④ 瓶の蓋を十分緩めて、121℃/40 分(1 分あたり 500ml の場合)高圧蒸気滅菌にかけた。
※高圧蒸気滅菌をすることにより DEPC を除去する。滅菌後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度高圧蒸気滅菌を行う。
※DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸わないように気を付けること。また、滅菌装置内に溜まった水は、気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるため、その排水は責任をもって処理すること(大量の水と共に排水口へ)。

<Random Primers、各 Primer について>
これらの Stock Solution(S.S)は粉末状の試薬に DEPC 処理水を適宜加えて作成した。詳細は添付の取扱説明書に従った。
<滅菌水の作製>
① 脱イオン水を密閉できるガラス瓶(赤蓋の 1L メディウムビン)に入れた。
② 蓋をきっちり閉めた後、滅菌テープで封印し、121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。